

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

Facultad de Medicina Humana Programa Profesional de Medicina Humana



TITULO:

**“Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en
células epiteliales de pulmón e intestino ”**

Tesis Presentada por el Bachiller:

TOMAS RAUL WICHE SALINAS

Para Obtener el Título de:

MÉDICO CIRUJANO

Arequipa- Perú

2015

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres Víctor y Carmen

A mis abuelitos en especial a mi papá Fidel que me mira desde el cielo

A toda mi familia y amigos



AGRADECIMIENTO

A Dios por permitir mi existencia.

A mi amado padre Víctor que a pesar de la distancia permanece su sabia
instrucción

A mis maestros por su guía en mi formación académico

A todos aquellos que me brindaron consejo en algún momento a lo largo de mi
vida



EPÍGRAFE

“Y todo lo que hagáis, hacedlo de corazón , como para el Señor y no para los
hombres”

Colosenses 3:23



INDICE GENERAL

Contenido

RESUMEN.....	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN.....	4
CAPITULO I.....	6
CAPITULO II	13
CAPITULO III	32
CAPITULO IV.....	44
BIBLIOGRAFÍA.....	47
ANEXO 1	51

RESUMEN

Introducción: Se ha demostrado que el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1(VIH-1) altera la homeostasis del tejido linfoide asociado a mucosas. El objetivo del presente estudio fue determinar si el VIH-1 interfiere con la capacidad de las células epiteliales intestinales vs alveolares para producir quimiocinas que atraen linfocitos Th17 .**Materiales y Métodos:** Se utilizaron las células intestinales HT-29, alveolares A549 y uterinas TZM-BL. Se utilizaron las citoquinas recombinantes TNF-alpha, IL-17 , IL1B y el antígeno LPS para estimular las células epiteliales. Se cuantifico la producción de IL8 y CCL20 por ELISA. La expresión de los correceptores CD,CCR5,CXCR4, EPCAM e IL-17R fueron cuantificados por citometría de flujo. Las células epiteliales fueron expuestas a las cepas virales con tropismo CCR5, tropismo CXCR4 y la integración de DNA fue cuantificada por PCR. **Resultados:** La quimiocina CCL20 es producida por las células HT-29, pero no por las células A549 en respuesta a la acción sinérgica de TNF-a e IL-17. IL-8 es producida por las células HT-29 sólo en respuesta a TNF-a y las células A549 la producen tanto como respuesta a IL-1b y TNF-a. El VIH interfiere con la capacidad de la célula epitelial intestinal y alveolar para producir CCL20 dependiendo del tipo celular. La cepa VIH R5 disminuye la producción de CCL20 en respuesta al estímulo solo con TNF-a y al mediado por TNF/IL-17 en las células HT-29. El virus X4 y R5 aumenta la producción de CCL20 respuesta al estímulo solo con TNF-a y al mediado por TNF/IL-17 en las células A549. Por lo tanto, el VIH interferir directamente con la capacidad de las células epiteliales intestinales y alveolares para atraer a las células Th17. Esta información será fundamental

para las estrategias de control del daño mucosal en el contexto de una
infección por VIH-1



ABSTRACT

Introduction: It has been shown that the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) alters homeostasis mucosa-associated lymphoid tissue. The aim of this study was to determine whether HIV-1 interferes with the ability of intestinal epithelial cells to produce alveolar vs. attracting chemokines Th17 lymphocytes.

Materials and Methods: We used intestinal cells HT-29, A549 and uterine alveolar TZM-BL. Used recombinant cytokines TNF-alpha, IL-17, IL1B and LPS antigen to stimulate the cells quantified epiteliales. Se IL8 and CCL20 production by ELISA. The expression of CD-receptors, CCR5, CXCR4, and IL-17R EPCAM were quantified flujo. Las cytometry epithelial cells were exposed to viral strains with CCR5, CXCR4 and integration of DNA was quantified by PCR. Results: CCL20 chemokine is produced by HT-29 cells, but not for A549 cells in response to the synergistic action of TNF-a and IL-17. IL-8 is produced by HT-29 cells only in response to TNF-a A549 cells and the response to produce both IL-1b and TNF-a. HIV interferes with the ability of the intestinal epithelial cell to produce alveolar CCL20 and depending on cell type. R5 HIV strain decreases production of CCL20 in response to stimulation with TNF-alpha alone and mediated TNF/IL-17 in HT-29 cells. X4 and R5 virus production increases only CCL20 stimulus response with TNF-a and TNF mediated TNF/IL-17 in A549 cells.

Therefore, HIV directly interfere with the ability of the intestinal epithelial cells and alveolar to attract Th17 cells. This information will be critical to the control strategies of mucosal damage in the context of HIV-1 infection.

INTRODUCCIÓN

La infección de VIH-1(virus de la inmunodeficiencia humana tipo1) está asociada a una fuerte depleción de linfocitos T CD4 con una polarización en la depleción de linfocitos Th17 a nivel de la mucosa intestinal. Esto conlleva a una translocación bacteriana que es la causa de la activación inmune crónica y progresión de la enfermedad (Ancuta, P., A. Kamat, et al. 2008; Ancuta, P., P. Monteiro, et al. 2010; Brenchley, J. M. and D. C. Douek 2008).

Las células epiteliales juegan un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis a nivel de la mucosa intestinal vía el reclutamiento de células de inmunidad innata (neutrófilos) y adaptativa(Th17). Las células Th17 cumplen un doble rol en la infección por VIH. Contribuyen a la defensa del huésped mediante la producción de IL-17 que estimula a las células epiteliales a producir quimiocinas que atraen mas Th17(CCL20) y neutrófilos (B-defensinas) a los tejidos mucosales. Por otra parte cumplen un rol deletéreo ya que son altamente susceptibles a la replicación viral. (Kolls, J. K. and S. A. Khader 2010; Gosselin, A., P. Monteiro, et al.2010; Monteiro, P., A. Gosselin, et al. 2011)

La frecuencia de linfocitos Th17 se encuentra disminuida en el GALT(tejido linfoide asociado a mucosa intestinal) pero no a nivel pulmonar en pacientes infectados por VIH-1, sugiriendo que existe un mecanismo diferencial en el reclutamiento de estas células en los diferentes compartimientos anatómicos (Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. 2008)

En el presente estudio evaluó la hipótesis que desea establecer si VIH interfiere en la capacidad funcional de las células epiteliales intestinales y pulmonares

de manera diferencial para producir quimiocinas responsables del reclutamiento de linfocitos Th17.

Para ello se exploró la capacidad de las células epiteliales en producir quimiocinas específicas para la atracción de linfocitos Th17(CCL20) y neutrófilos (IL-8), la permisividad de las células epiteliales pulmonares y alveolares a la infección por VIH-1 in vitro y el impacto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas específicas para la quimiotaxis de células Th17 por las células epiteliales intestinales y alveolares.





CAPITULO I

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación

Cultivo de Células epiteliales.

En el presente trabajo se utilizaron células epiteliales intestinales humanas HT-29 (ATTC HTM-38) originadas de adenocarcinoma de colon cultivadas en medio de cultivo específico McCoy 5^a(ATCC), las células epiteliales alveolares humanas A549 (ATTC CCL-185) originadas de carcinoma de pulmón cultivadas en medio específico F-12k (GIBCO) y las células epiteliales cervicales humanas TZM-BL (ATTC) originadas de carcinoma de cuello uterino, modificadas genéticamente para lograr la expresión constitutiva de los correceptores CD4 y CCR5, cultivadas en medio de cultivo DMEM(GIBCO). Las medios de cultivo de las 3 líneas celulares fueron suplementados al 10 % con suero fetal bovino(Sigma) y al 1 % con los antibióticos penicilina(100 U/ml) y estreptomycin(10 U/ml) cultivándose en matraces T75(Nunc) a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada 48 horas y las células se recolectaron cada 3 días con tripsina al lograr confluencia(Tripsina 0.25% y EDTA 0.53mM).

Estimulación con citoquinas recombinantes y antígeno bacteriano

Las células epiteliales de origen intestinal (HT-29 150 000 células/ml) y de origen alveolar (A549 50 000 células/ml) fueron cultivadas en las placas de cultivos Costar de 48 pozos en un volumen final de 1 ml para alcanzar 80 % de confluencia 24 horas después de ser cultivadas. Después de haber alcanzado el 80 % de confluencia fueron estimuladas por las citoquinas recombinantes

TNF alpha(R and D Systems), IL-1B (R and D Systems), IL-17(R and D Systems) y el antígeno bacteriano LPS (Sigma Aldrich) en diferentes condiciones y concentraciones por 24 horas. Las condiciones de estimulación se realizaron por triplicado en todos los experimentos.

Cuantificación de las quimiocinas CCL20 y IL-8 por ELISA

Los sobrenadantes de los cultivos celulares condicionados bajo diferentes patrones de estimulación fueron recolectados y almacenados a -20°C hasta su uso. Las quimiocinas CCL20 (R and D Systems) e IL-8(R and D Systems) fueron cuantificadas por ELISA según las instrucciones del proveedor.

Citometría de Flujo

Las células epiteliales HT-29, A549 y T2M-BL fueron recolectadas utilizando EDTA 1mM de los matraces T75(Nunc) y lavadas 2 veces con buffer FACS(PBS 1X, 10% FBS, 0.02% sodium azide) e incubadas con el mismo buffer por 10 min a 4°C(etapa de saturación). Posteriormente las células fueron marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas de membrana CD4(0.5 ul/10e6 células, FITC BD Biosciences), CXCR4(0.5 ul/10e6 células, PE, BD Pharmingen), CCR5(0.5 ul/10e6 células, PE, eBioscience), EPCAM(10 ul/10e6 células, FITC, Miltenyi Biotec), IL-17R(5 ul/10e6 células, PE, eBioscience) en un volumen de 50 ul, las células se incubaron 30 min a 4°C en la oscuridad con los fluorocromos. Luego se realizó un lavado de las células con tampón FACS para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células fueron fijadas con el tampón de Fijación (Buffer FACS, 2% formaldehído) en un volumen final de 250ul. Se utilizó un citómetro de flujo LSRII de 10 colores (BD,

Franklin Lakes) para la adquisición de eventos y para el análisis de los datos el software BD DIVA (BD, Franklin Lakes).

Cepas virales, infección y estimulación de las células epiteliales

Se utilizaron las cepas de VIH NL4.3Bal GFP de tropismo al correceptor CCR5, la cepa viral NL4.3 GFP de tropismo al correceptor CXCR4 y la cepa viral VSV-G GFP que ingresa libremente por endocitosis a las células. (Doms, R. W. 2001). Las cepas virales son producidas por transfección de DNA plasmídico que contiene el genoma completo de los virus utilizados en células 293T utilizando el reactivo de transfección FUGENE6 (Roche) siguiendo las recomendaciones del proveedor. El sobrenadante fue colectado 8 horas después y la concentración del stock viral fue medida por ELISA específico para proteína p24 de VIH-1.

Para el estudio de la permisividad celular e integración de DNA viral al genoma de las células epiteliales se cultivaron células epiteliales de origen intestinal (HT-29 300 000 células/ml), de origen alveolar (A549 100000 células/ml) y de origen cervical (TZM-BL 80000 células/ml) en las placas de cultivos Costar de 48 pozos en un volumen final de 1 ml. Después de 24 horas se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y se expuso a las células a las cepas virales NL4.3, NL4.3Bal y VSV-G (50 ng de proteína p24 de VIH-1 en 150 µl de medio de cultivo / pozo) dejando incubar por 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de las 3 horas se añadió a cada pozo 850 µl de medio de cultivo y se dejó incubando 24 horas adicionales. Después de esto se cambió el medio de cultivo y dejó incubando 24 horas más para luego recolectar las células con Tripsina-EDTA.

Se lavaron dos veces las células con PBS 1X y los pellets secos fueron almacenados a -80°C para su posterior análisis por PCR en tiempo real.

Para el estudio del efecto de las distintas cepas virales en la funcionalidad de las células para producir quimiocinas las células epiteliales de origen intestinal (HT-29 150 000 células/ml) y de origen alveolar (A549 50 000 células/ml) se cultivaron en las placas de cultivo Coostar de 48 posos en un volumen de 1 ml para alcanzar 80 % de confluencia 24 horas después de haber sido sembradas. Después de 24 horas se aspiró el medio de cultivo de cada pozo y se expuso a las células a las cepas virales NL4.3, NL4.3Bal y VSV-G (50 ng de proteína p24 de VIH-1 en 150 μl de medio de cultivo / pozo) dejando incubar por 3 horas a 37°C y 5% CO_2 . Después de la exposición al virus se realizaron 3 lavados con medio de cultivo y se procedió a estimular las células bajo las siguientes condiciones: TNF (10 ng/ml), IL-17 (10 ng/ml) y TNF (10 ng/ml)/IL-17 (10 ng/ml). Se recolectaron los sobrenadantes y almacenaron a -20°C para la posterior cuantificación de quimiocinas por ELISA.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para determinar la integración del VIH-1 en el genoma de las células epiteliales.

La cuantificación del DNA de VIH-1 integrado en genoma de las células susceptibles a infección fue desarrollada como previamente se describió utilizando la técnica FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Chomont, N., M. El-Far, et al. 2009). Las células epiteliales fueron digeridas en un buffer de proteinasa K (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) 10^5 células / 15 μl y se utilizaron 15 μl de lisado para la amplificación. El DNA viral integrado fue amplificado primero (12 ciclos) utilizando dos primers Alu (Alu1 y Alu2) y un

primer específico para la secuencia LTR del VIH-1 etiquetado con la secuencia λ , el gen CD3 fue también amplificado en la misma reacción. El ciclado de la primera reacción fue 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 10 min a 72°C precedido de una etapa de desnaturalización de 8 min a 95°C y una etapa final de elongación de 4 min a 95°C. Luego los amplicones de VIH y CD3 obtenidos de la primera reacción fueron sometidos a una nueva amplificación de la siguiente manera. El DNA viral integrado fue amplificado usando un primer complementario a la secuencia λ y otra complementaria a la región U5 LTR del virus junto a dos sondas fluorescentes específicas para la región LTR del virus. Para la amplificación del gen CD3 se utilizaron dos primers específicos junto a dos sondas fluorescentes específicas para CD3. El ciclado de la segunda reacción fue 10 seg a 95°C, 10 seg a 60°C y 15seg a 72°C precedido de una etapa de desnaturalización de 8 min a 95°C y una etapa final de elongación de 4 min a 95°C. Para la curva estándar fueron utilizadas las células ACH2 (The National Institutes of Health AIDS reagent program) portadoras de una sola copia integrada del virus. Como control negativo se utilizaron células HT-29, A549 Y TZM-BL no infectadas. Los resultados se expresaron en número de copias de ADN proviral/10e6 células.

Análisis estadístico

Se evaluó la significancia de las diferencias observadas entre grupos utilizando el test t de student pareado. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5. Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados significativos. Cada condición experimental fue realizada en

triplicado y los gráficos muestran un resultado representativo de 3 experiencias realizadas en distinto tiempo.

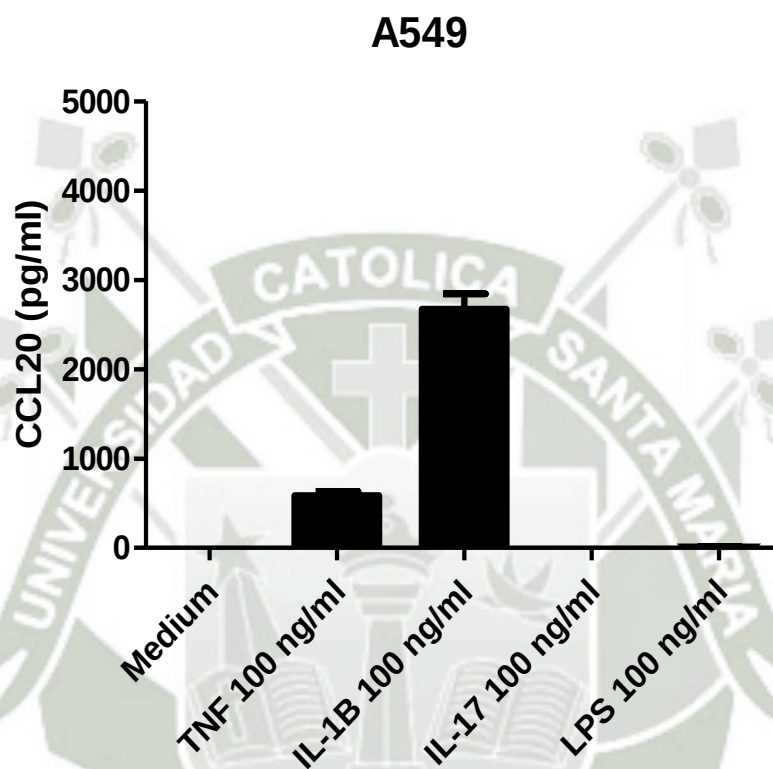




CAPITULO II RESULTADOS

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

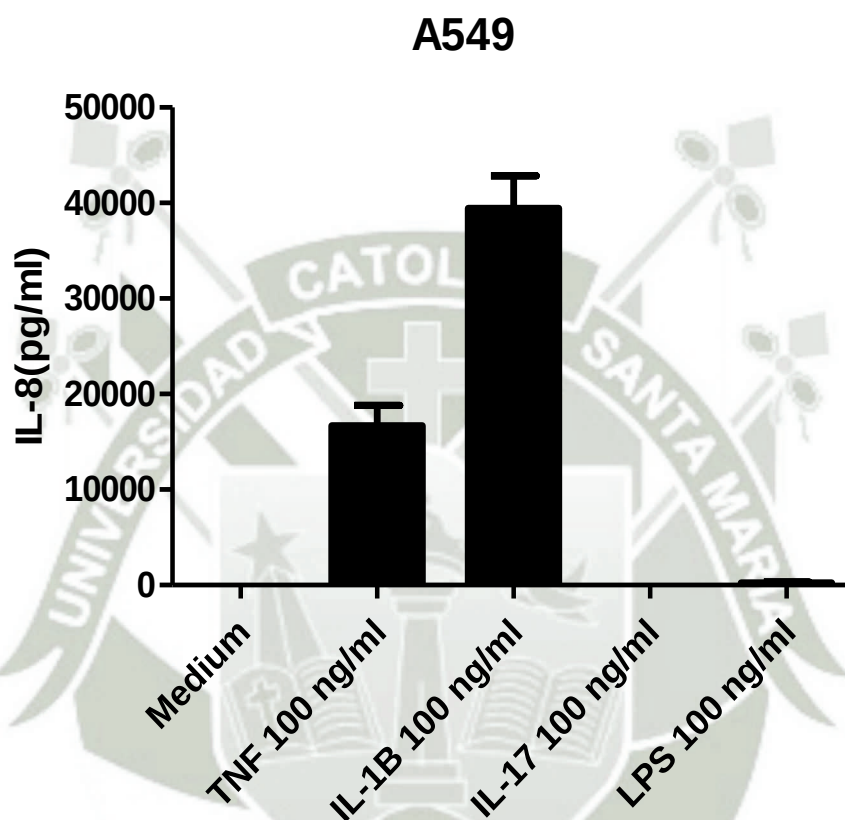
**Gráfico 1. Producción de CCL20 por las células epiteliales alveolares en
respuesta a diferentes estímulos inflamatorios.**



Las células epiteliales pulmonares A549 fueron estimuladas con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS a las dosis mostradas en el Gráfico 1. IL-1beta estimulo una mayor producción de CCL20 seguida de TNF-alpha. No hubo respuesta a IL-17 y LPS.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

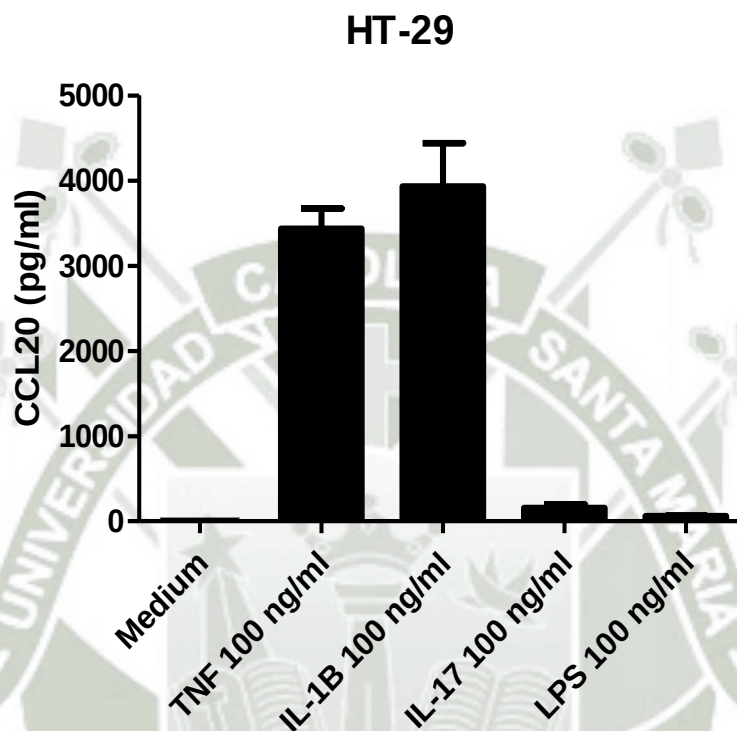
Gráfico 2. Producción de IL-8 por las células epiteliales alveolares en
respuesta a diferentes estímulos inflamatorios.



Las células epiteliales pulmonares A549 fueron estimuladas con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS a las dosis mostradas en el Gráfico 2. IL-1beta estimulo una mayor producción de IL-8 seguida de TNF-alpha. No hubo respuesta a IL-17 y LPS.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

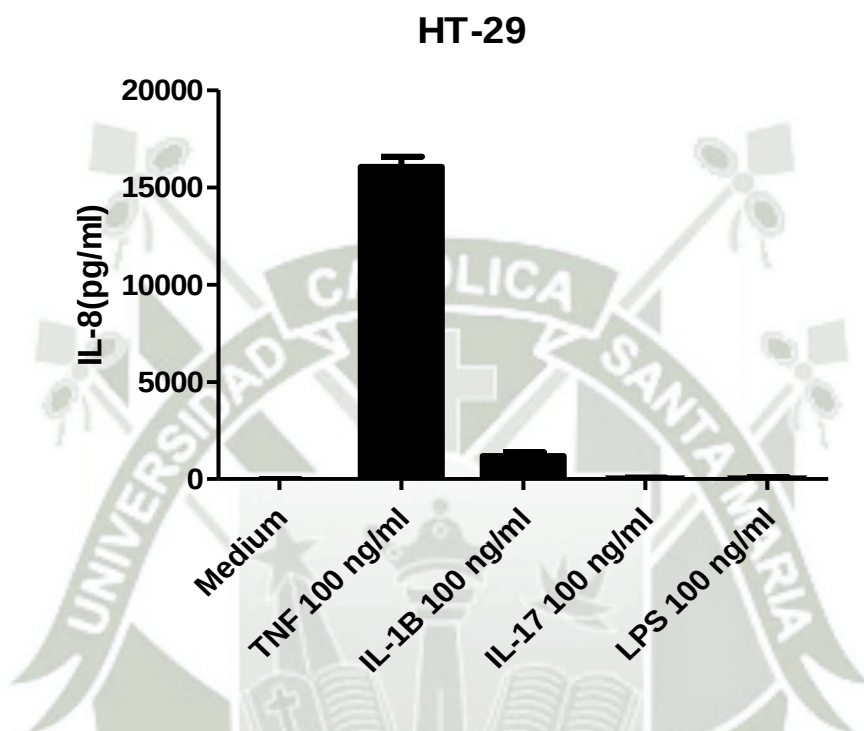
**Gráfico 3. Producción de CCL20 por las células epiteliales intestinales en
respuesta a diferentes estímulos inflamatorios.**



Las células epiteliales intestinales HT-29 fueron estimuladas con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS a las dosis mostradas en el Gráfico 3. IL-1beta y TNF-alpha estimularon de forma similar la producción de CCL-20. No hubo respuesta a IL-17 y LPS.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

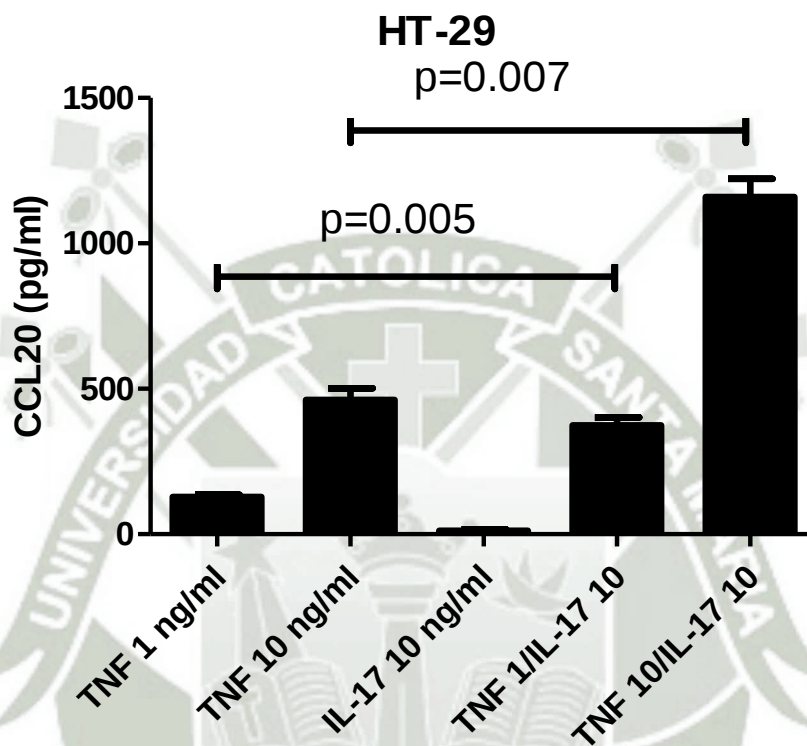
**Gráfico 4. Producción de IL-8 por las células epiteliales intestinales en
respuesta a diferentes estímulos inflamatorios.**



Las células epiteliales intestinales HT-29 fueron estimuladas con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS a las dosis mostradas en el Gráfico 4. Únicamente TNF-alpha estimulo la producción de IL-8. No hubo respuesta a IL-17, LPS e IL-1B.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

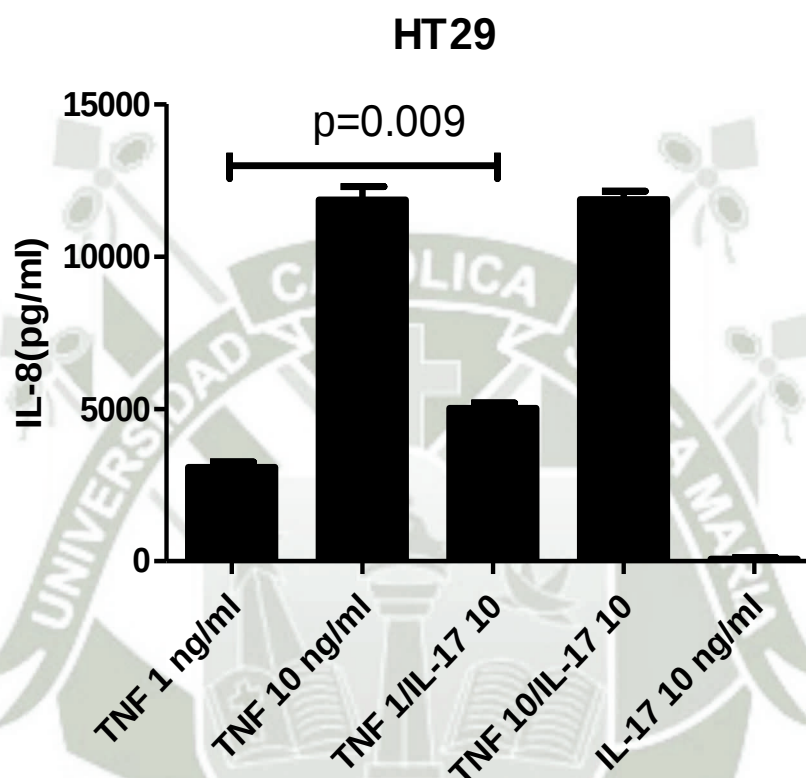
Gráfico 5. Sinergia entre TNF-alpha e IL-17 en la inducción de producción
de CCL20 en las células epiteliales intestinales.



Se evaluó la coestimulación de las células epiteliales intestinales HT-29 con TNF-alpha e IL-17 encontrándose un efecto sinérgico entre ambas interleucinas sobre la producción de CCL20 el cual fue estadísticamente significativo.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

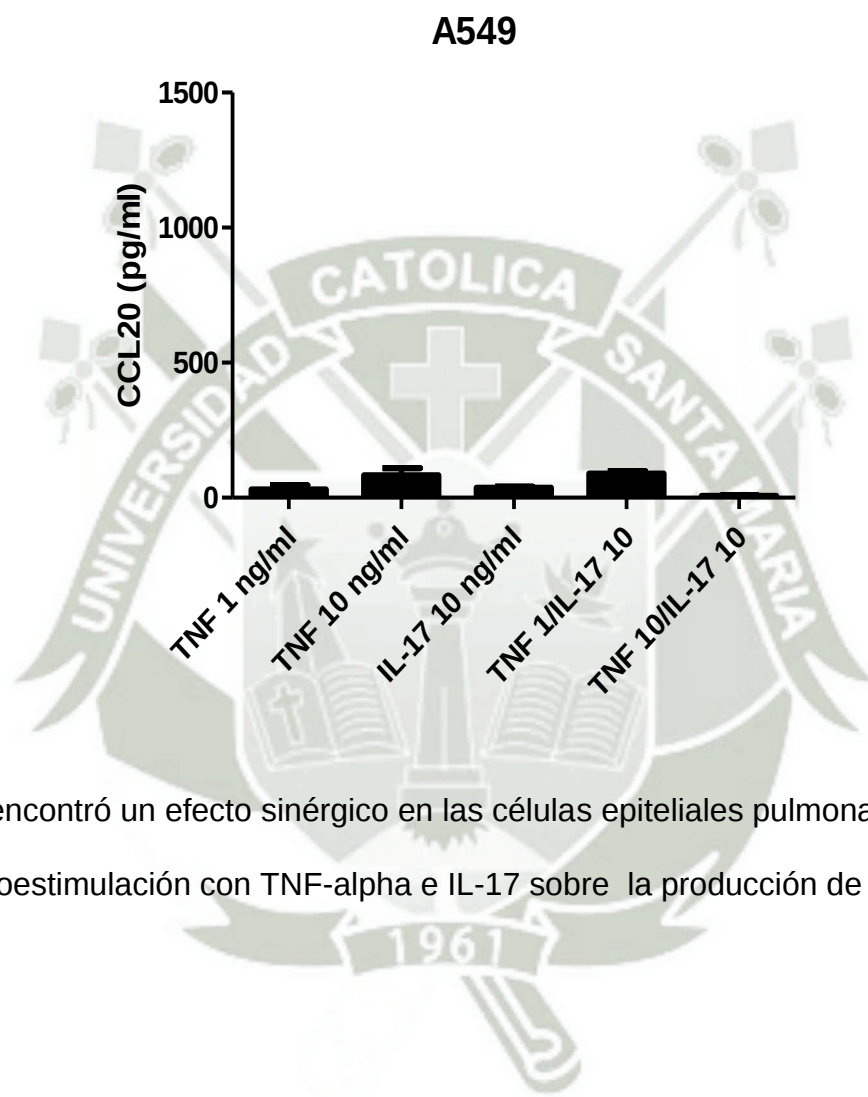
Gráfico 6. Sinergia entre TNF-alpha e IL-17 en la inducción de producción
de IL-8 en las células epiteliales intestinales.



Se evaluó la coestimulación de las células epiteliales intestinales HT-29 con TNF-alpha e IL-17 encontrándose un efecto sinérgico entre ambas interleucinas sobre la producción de IL-8 solo a dosis bajas de TNF-alpha el cual fue estadísticamente significativo.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

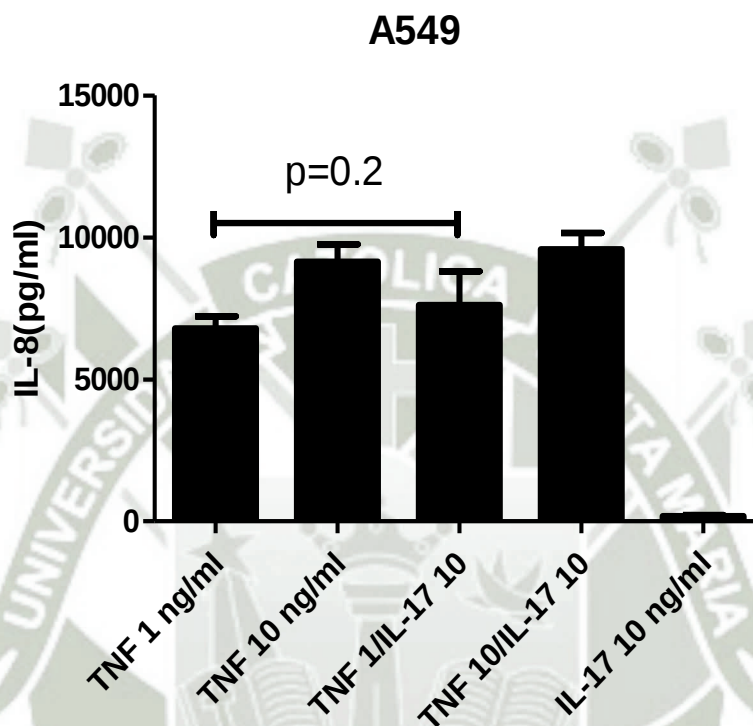
**Gráfico 7. Ausencia de sinergia entre TNF-alpha e IL-17 en la inducción de
producción de CCL20 en las células epiteliales pulmonares.**



No se encontró un efecto sinérgico en las células epiteliales pulmonares A549 a la coestimulación con TNF-alpha e IL-17 sobre la producción de CCL20.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

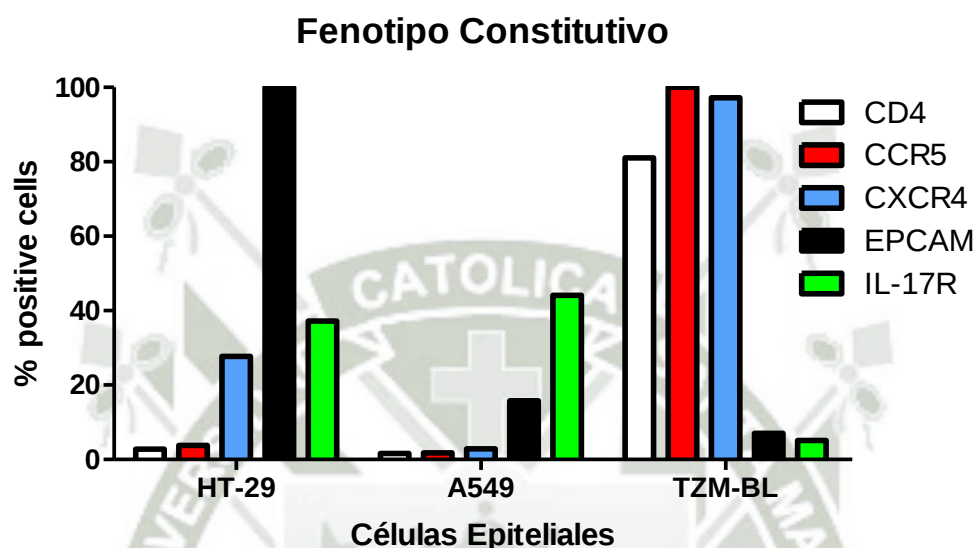
Gráfico 8. Ausencia de sinergia entre TNF-alpha e IL-17 en la inducción de
producción de IL-8 en las células epiteliales pulmonares.



No se encontró un efecto sinérgico en las células epiteliales pulmonares A549
a la coestimulación con TNF-alpha e IL-17 sobre la producción de IL-8.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

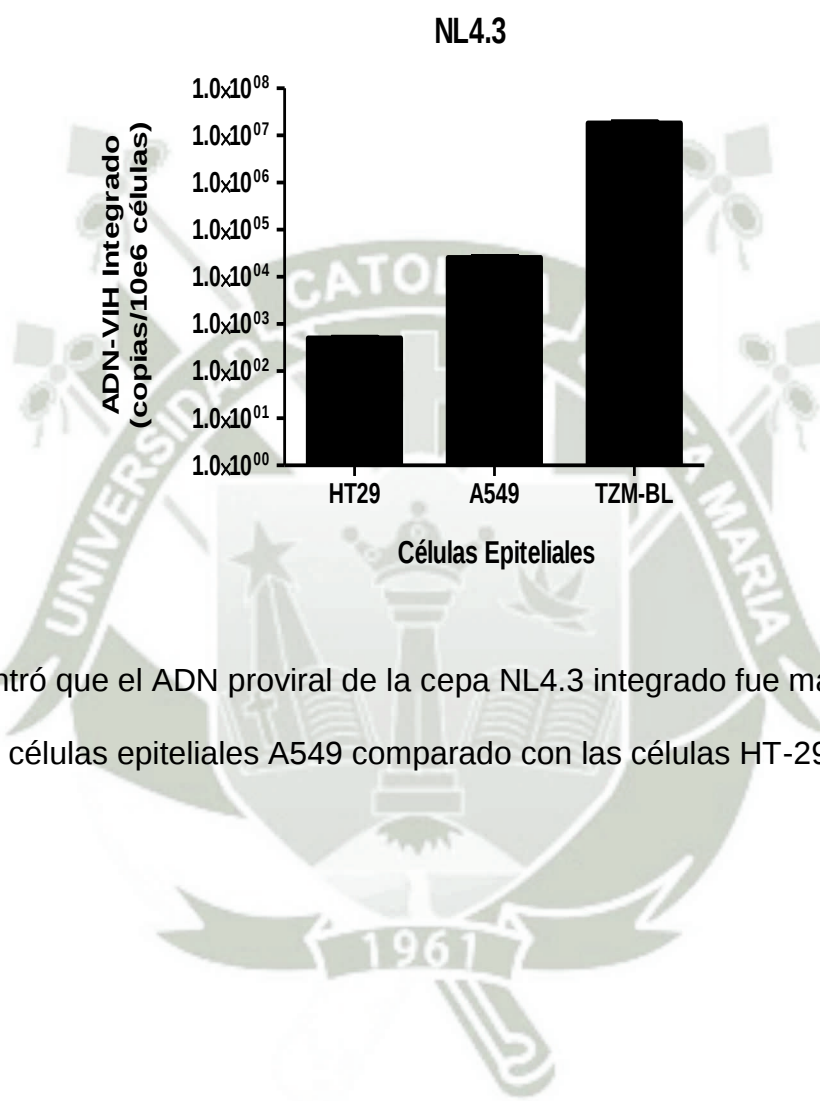
Gráfico 9. Análisis de la expresión de CD4, CCR5, CXCR4, EPCAM y IL-17R en la superficie de las células epiteliales por citometría de flujo.



Las células epiteliales pulmonares A549 no expresan constitutivamente los receptores CD4, CCR5, CXCR4 mientras que las células epiteliales intestinales únicamente expresan el receptor CXCR4.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

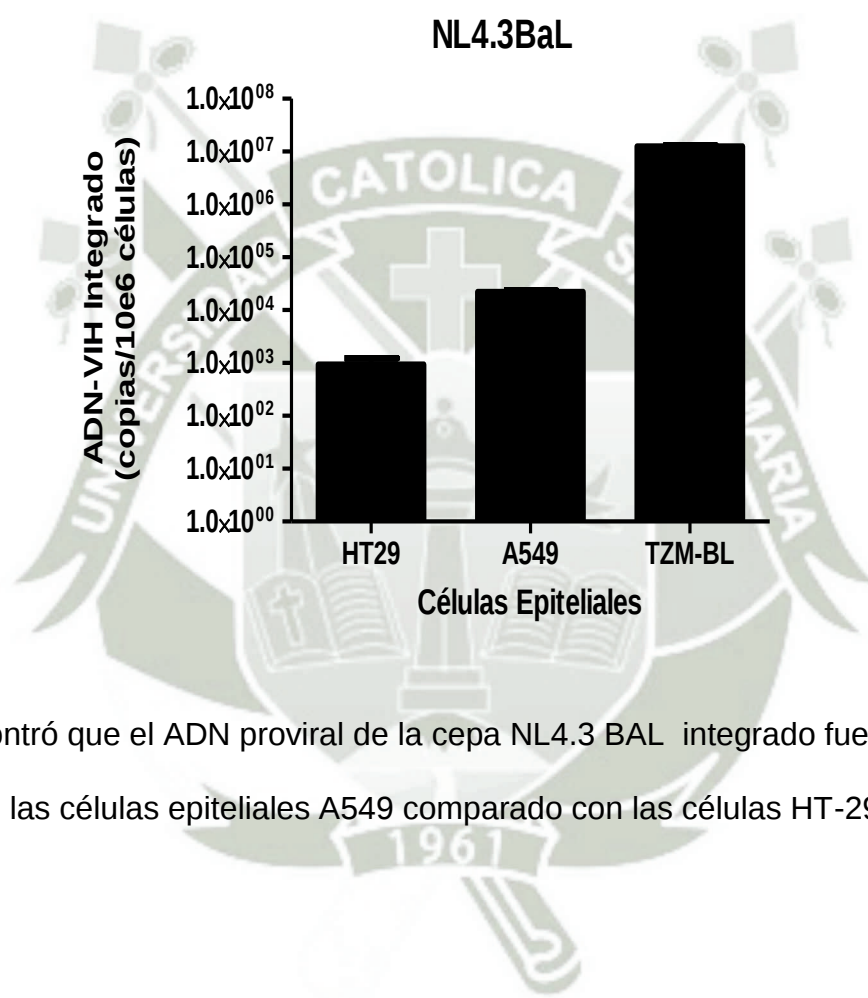
Gráfico 10. Cuantificación del genoma pro viral de la cepa NL4.3 en las
células epiteliales.



Se encontró que el ADN proviral de la cepa NL4.3 integrado fue mayor en las células epiteliales A549 comparado con las células HT-29.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

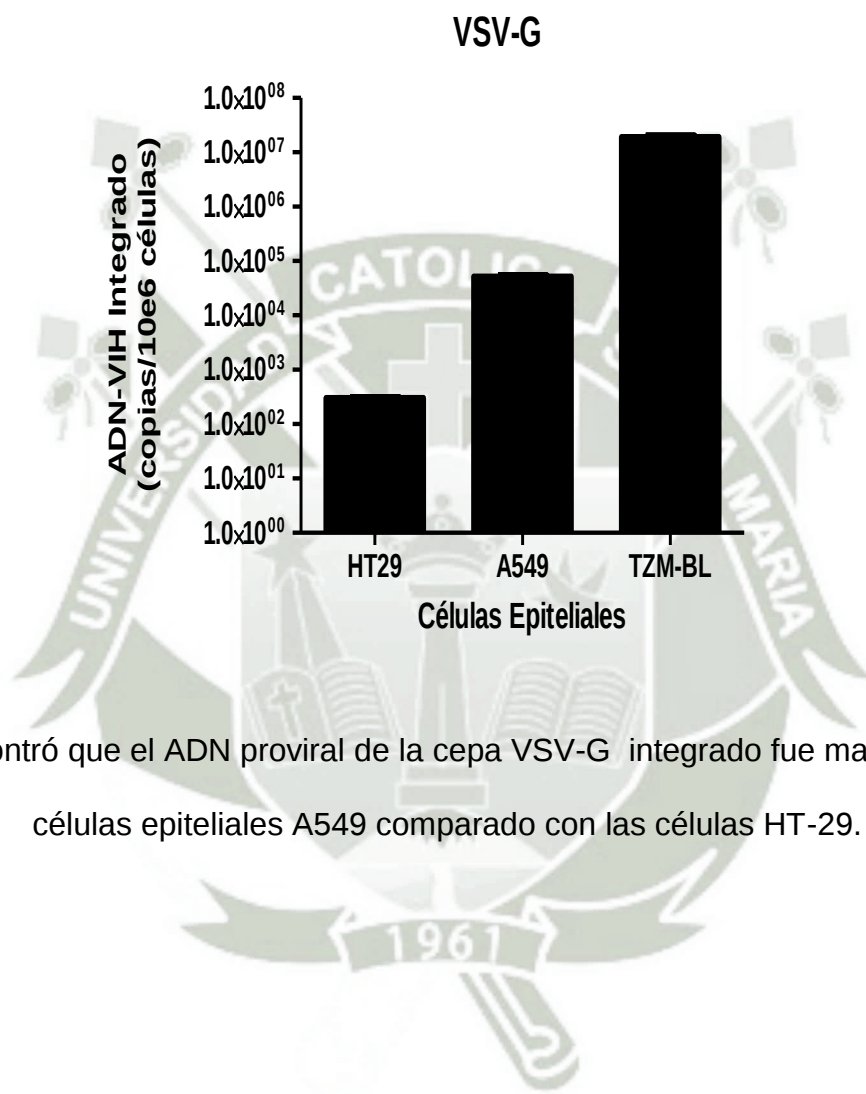
Gráfico 11. Cuantificación del genoma pro viral NL4.3Bal en las células epiteliales.



Se encontró que el ADN proviral de la cepa NL4.3 BAL integrado fue mayor en las células epiteliales A549 comparado con las células HT-29.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

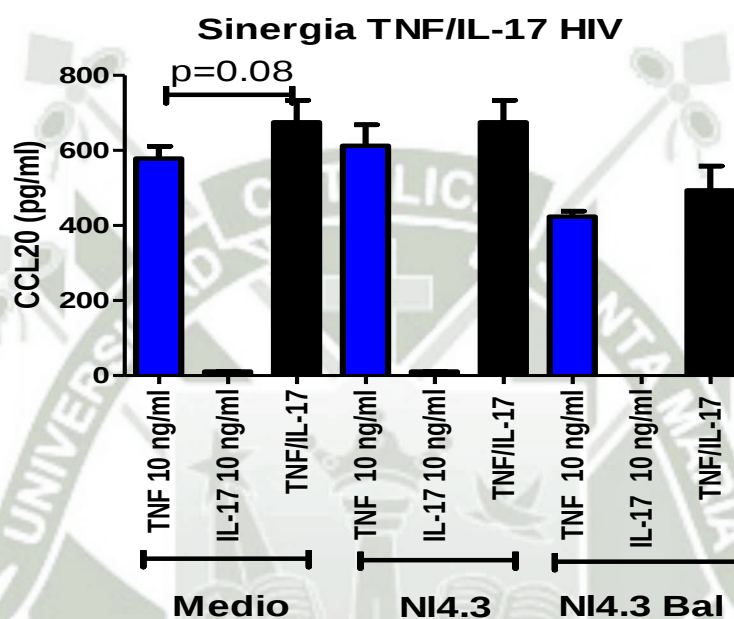
**Gráfico 12. Cuantificación del genoma pro viral de la cepa VSV-G en las
células epiteliales.**



Se encontró que el ADN proviral de la cepa VSV-G integrado fue mayor en las células epiteliales A549 comparado con las células HT-29.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

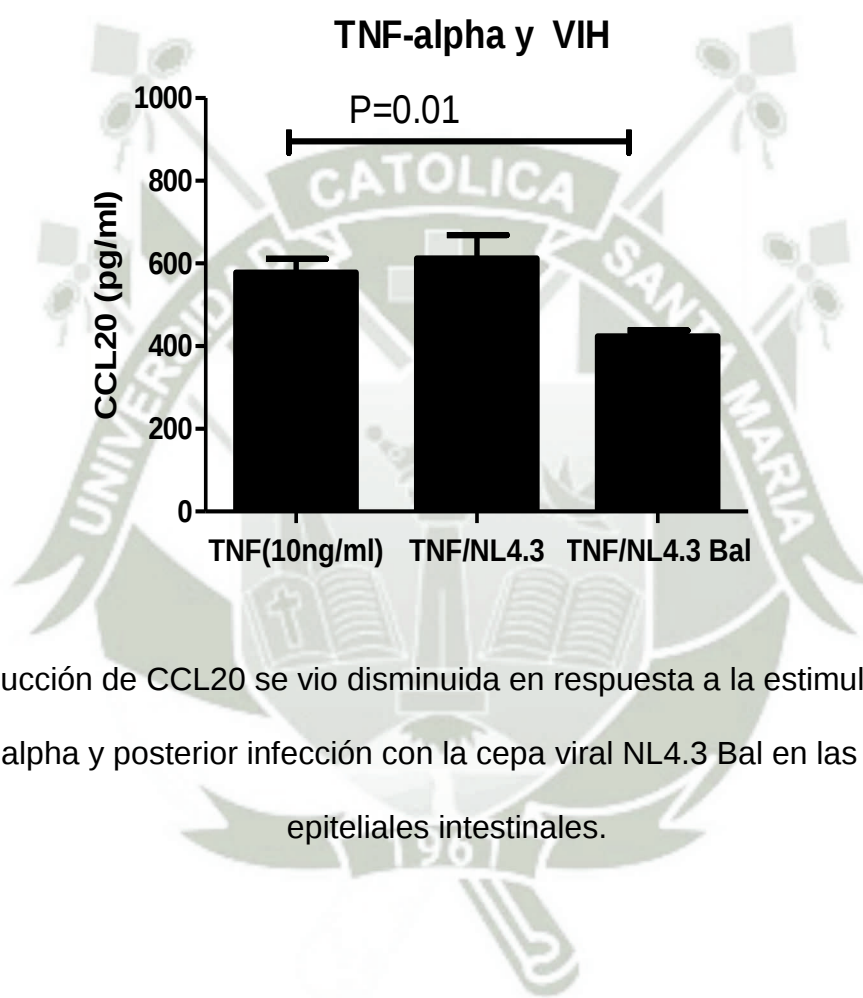
Gráfico 13. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales intestinales.



Las células epiteliales intestinales fueron estimuladas con TNF-alpha y TNF-alpha/IL-17 para luego ser infectadas con la cepa viral NL4.3 Y NL4.3 Bal. Se midió posteriormente la producción de CCL20.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

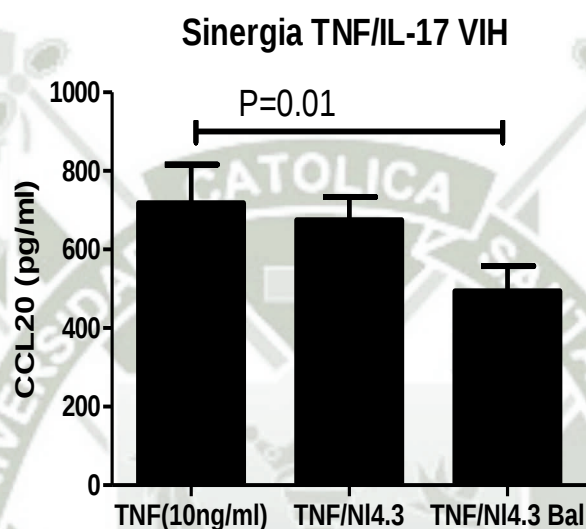
Gráfico 14. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales intestinales.



La producción de CCL20 se vio disminuida en respuesta a la estimulación con
TNF-alpha y posterior infección con la cepa viral NL4.3 Bal en las células
epiteliales intestinales.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

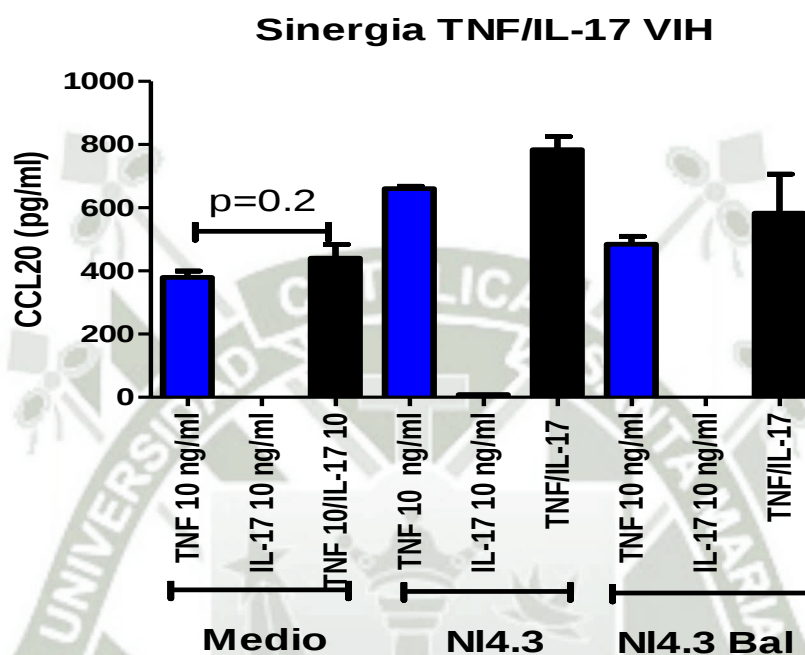
**Gráfico 15. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales intestinales.**



La producción de CCL20 se vio disminuida en respuesta a la estimulación con TNF- α /IL-17 posterior infección con la cepa viral NL4.3 Bal en las células epiteliales intestinales.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

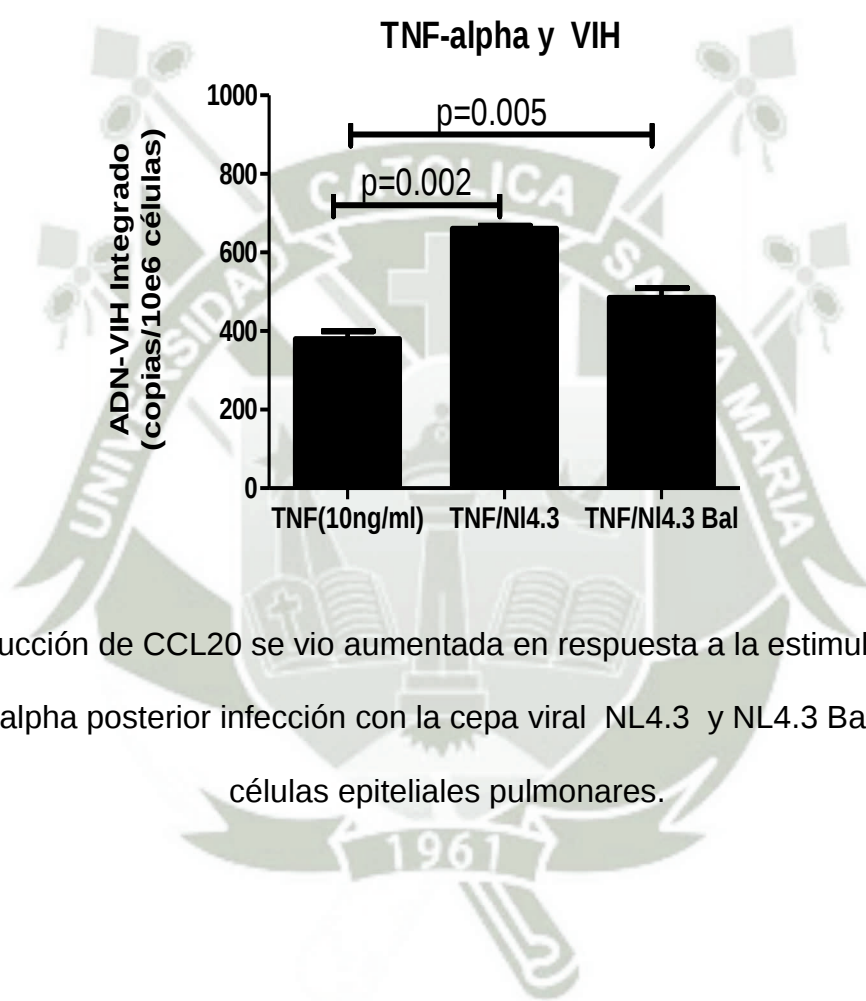
Gráfico 16. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales alveolares.



Las células epiteliales intestinales fueron estimuladas con TNF-alpha y TNF-alpha/IL-17 para luego ser infectadas con la cepa viral NL4.3 Y NL4.3 Bal. Se midió posteriormente la producción de CCL20.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

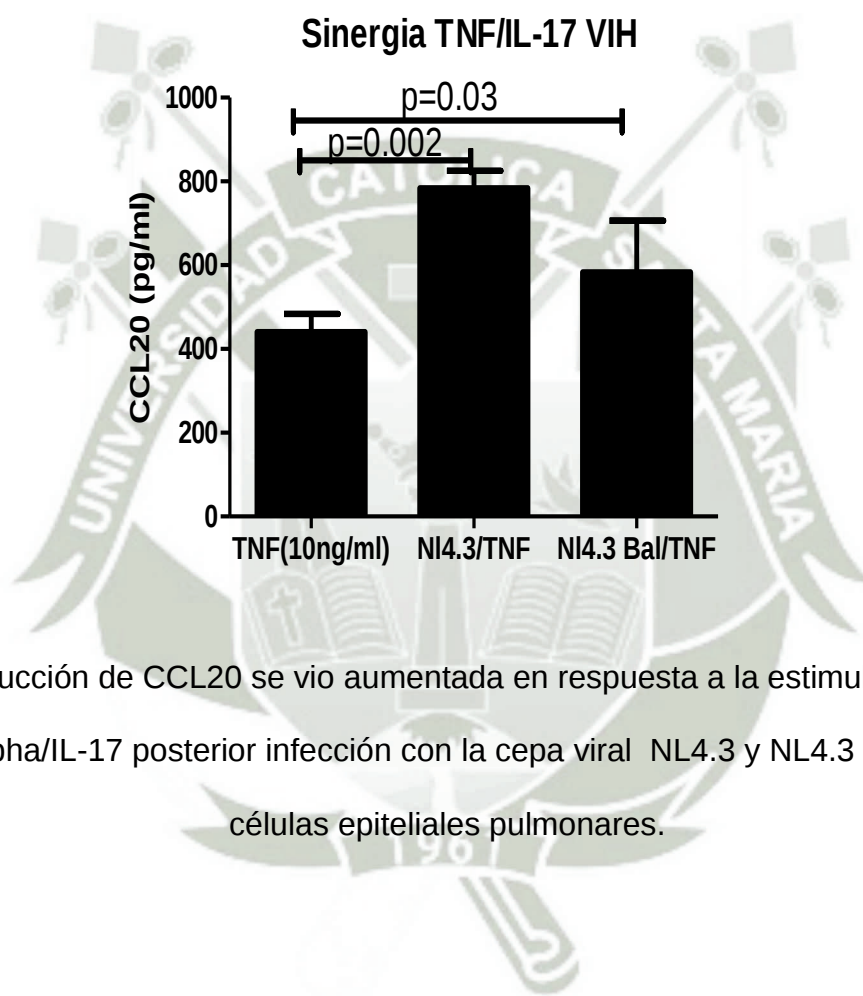
**Gráfico 17. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales alveolares.**



La producción de CCL20 se vio aumentada en respuesta a la estimulación con TNF-alpha posterior infección con la cepa viral NL4.3 y NL4.3 Bal en las células epiteliales pulmonares.

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

**Gráfico 18. Efecto de la infección por VIH en la producción de CCL20 en
las células epiteliales alveolares.**





CAPITULO III

DISCUSIÓN Y COMENTARIOS

DISCUSIÓN

El VIH-1 tiene la capacidad de alterar las barreras epiteliales principalmente la de mucosa intestinal y alterar la producción de diferentes quimiocinas importantes para la quimioatracción de linfocitos.

En el presente estudio se cuantifico la producción de CCL20 y IL-8 por las células epiteliales alveolares e intestinales en respuesta a diferentes estímulos inflamatorios utilizando las citoquinas TNF-alpha(100 ng/ml), IL-1B(100 ng/ml), IL-17(100 ng/ml) y el antígeno bacteriano LPS(100 ng/ml). En nuestro estudio se encontró una producción diferencial de CCL-20 e IL-8 entre las células epiteliales pulmonares e intestinales en respuesta al estímulo inflamatorio. Las células epiteliales tienen la capacidad de producir quimiocinas ligandos de los receptores CCR6 y CXCR1/2 las cuales son específicos para los linfocitos Th17 y neutrófilos respectivamente.

Como se muestra en los Gráficos 1-4 se tiene una buena respuesta al estímulo con IL-1B por parte de ambos tipos celulares para la producción de CCL20. La respuesta al estímulo con TNF-alpha para la producción de CCL20 es mayor en las células epiteliales intestinales respecto a las células epiteliales alveolares. En las células epiteliales alveolares la producción de IL-8 es dependiente en mayor proporción de IL-1B respecto a TNF-alpha mientras que en las células epiteliales intestinales la IL-1B no es capaz de inducir la producción de IL-8 siendo en estas células la producción de esta citoquina dependiente de TNF-alpha.

Tanto la IL-17 y el antígeno bacteriano LPS no son capaces de estimular la producción de CLL20 e IL-8 en estos tipos celulares (Hartupee, J., C. Liu, et al. 2007).

Esta diferente respuesta al estímulo inflamatorio para la producción de CLL20 e IL-8 sugiere que las células epiteliales alveolares e intestinales regulan de forma diferente la atracción de linfocitos TH17 y neutrófilos a las mucosas en respuesta a TNF-alpha e IL-1B.

Efecto sinérgico de TNF-alpha e IL-17 en la producción de CCL20 en las células epiteliales intestinales y no en las células epiteliales pulmonares.

La IL-17 es muy importante en la comunicación entre las células epiteliales y los linfocitos Th17 y en consecuencia en el mantenimiento de la inmunidad de las mucosas (Dandekar, S., M. D. George, et al. 2010). Igualmente IL-17 ejerce un efecto positivo en la producción de quimiocinas que atraen linfocitos Th17 y neutrófilos (Dann, S. M. and L. Eckmann 2007). Se ha demostrado que la IL-17 y TNF-alpha actúan sinérgicamente en la producción de ARNm de CLL20 e IL-8 (Lee, J. W., P. Wang, et al. 2008). En este contexto es que evaluamos el efecto sinérgico que producen TNF-alpha e IL-17 en la producción de CLL20 e IL-8 en las células epiteliales intestinales y alveolares. Las condiciones de estimulación fueron las mostradas en los Gráficos 5-8 colectando los sobrenadantes 24 horas después de la estimulación para su posterior estudio por ELISA.

Los resultados mostrados en los Gráficos 5-8 muestran un efecto sinérgico notable de IL-17 sobre TNF-alpha en la producción de CLL20 en las células epiteliales intestinales. IL-17 por sí sola no es capaz de estimular la producción

de CLL20. La producción absoluta de CLL20 es dependiente de la concentración de TNF-alpha siendo mayor la producción y el efecto sinérgico al incrementar la dosis TNF-alpha.

En contraste a las células epiteliales intestinales, TNF-alpha e IL-17 no tienen un efecto sinérgico sobre las células epiteliales pulmonares en la producción de CLL20.

Las células epiteliales intestinales solo mostraron un efecto sinérgico estadísticamente significativo entre TNF-alpha e IL-17 en la producción de IL-8 cuando la estimulación con TNF-alpha es a dosis baja (1 ng/ml). Esta sinergia desaparece al incrementar la dosis de TNF-alpha (10 ng/ml). Las células epiteliales alveolares no muestran efecto sinérgico en la producción de IL-8 entre TNF-alpha e IL-17.

En conclusión, los resultados incluidos en las Gráficas 5-8 demuestran que la IL-17 ejerce un efecto sinérgico con TNF-alpha en inducir la producción de CCL20 en las células epiteliales intestinales más no en las células epiteliales alveolares. La IL-17 solo muestra efecto sinérgico con TNF-alpha en la producción de IL-8 en las células epiteliales intestinales a dosis baja de TNF-alpha. Por lo tanto la atracción de linfocitos Th17 a la mucosa intestinal estaría mediada de manera importante por el efecto sinérgico que ejerce IL-17 sobre TNF-alpha y la atracción de neutrófilos sería dependiente principalmente de TNF-alpha. La atracción de linfocitos Th17 y neutrófilos a la mucosa pulmonar es independiente de la IL-17 y solo estaría mediada por TNF-alpha.

Las células epiteliales pulmonares y alveolares expresan niveles bajos de CD4, CCR5 y CXCR4.

Para infectar las células objetivo el VIH-1 utiliza la molécula CD4 como receptor y como correceptores a los receptores de quimiocinas CCR5 y CXCR4. Para evaluar la permisividad relativa a la infección por VIH-1 se estudio la expresión constitutiva de estos receptores de membrana mediante citometría de flujo en las células epiteliales intestinales(HT-29),alveolares (A549) y cervicales(TZM-BL).

Los resultados mostrados en el Gráfico 9 indican que las células intestinales y pulmonares expresan niveles muy bajos casi indetectables de los correceptores CD4 y CCR5 mientras que hay cierta expresión del correceptor CXCR4 en las células epiteliales intestinales mas no en las células epiteliales pulmonares. Las células epiteliales cervicales (TZM-BL) expresan constitutivamente altos niveles de CD4, CCR5 Y CXCR4. En conclusión estos resultados muestran que las células epiteliales alveolares e intestinales tendría una baja permisividad a la infección por VIH mientras que las células epiteliales cervicales una alta permisividad por lo cual estas últimas células fueron utilizadas como un control positivo de infección viral.

Paralelamente se evaluó la expresión del receptor de IL-17(IL-17R) y la molécula de adhesión EPCAM. Las células epiteliales alveolares mostraron mayores niveles de expresión constitutiva del receptor de IL-17. Las células epiteliales intestinales mostraron altos niveles de expresión constitutiva de la molécula de adhesión EPCAM.

Cuantificación de la integración de genoma viral en las células epiteliales

Las células epiteliales intestinales y alveolares expresan niveles muy bajos casi indetectables de CD4, CCR5 y CXCR4, moléculas necesarias para el ingreso

del virus al interior de la célula, no obstante se ha demostrado que el virus puede ingresar a la células utilizando otros receptores dependientes de fosfolípidos. (Murdoch, C., P. N. Monk, et al. 1999; Jordan, N. J., G. Kolios, et al. 1999; Bomsel, M. and A. Alfsen 2003).

Se decidió evaluar la permisividad de las células epiteliales intestinales, alveolares y cervicales a la infección por las cepas virales NL4.3(conocida por su tropismo al correceptor CXCR4), NL4.3BAL(conocida por su tropismo al correceptor CCR5) y VSV-G(conocida por entrar libremente a las células mediada por un mecanismo de endocitosis). Como se muestra en las Gráficos 10-12 la integración del ADN viral fue muy baja en las células epiteliales intestinales para las 3 cepas virales mientras que niveles moderados de integración viral fueron detectados en las células epiteliales alveolares con las 3 cepas virales. Las células epiteliales cervicales mostraron altos niveles de integración viral como era previsible por su alta expresión de los receptores necesarios para el ingreso del virus.

Efecto del VIH-1 en la respuesta a TNF-alpha y TNF-alpha/IL-17 en las células epiteliales alveolares e intestinales

La quimiocina CCL20 es la principal responsable de la quimioatracción de linfocitos Th17 en las mucosas epiteliales. Se ha encontrado disminución en los niveles de ARNm de CCL20 en el intestino de macacos rehus tras la exposición al virus de inmunodeficiencia simiano (Lederer, S., D. Favre, et al. 2009). Por ello se decidió evaluar el efecto que tiene la exposición de las cepas virales NL4.3(tropismo CXCR4) y NL4.3Bal (tropismo CCR5) sobre la

respuesta a TNF-alpha y la sinergia TNF-alpha/IL-17 en la producción de la quimiocina CLL20.

La exposición de las células epiteliales intestinales a la cepa viral NL4.3Bal(tropismo CCR5) produce una disminución significativa en la producción de CLL20 tras el estímulo con la citoquina TNF-alpha y TNF-alpha/IL-17. La cepa viral NL4.3 (tropismo CXCR4) no tiene efecto significativo en la respuesta al mismo estímulo. (Gráficos 13-15)

La exposición de las células epiteliales alveolares a la cepa viral NL4.3 (tropismo CXCR4) produce un aumento significativo en la producción de CCL20 tras el estímulo con TNF-alpha y TNF-alpha/IL-17. La exposición a la cepa viral NL4.3Bal produjo igualmente un aumento significativo en la producción de CCL20 en respuesta a ambos estímulos pero en menor proporción que la cepa viral con tropismo CXCR4. (Gráfico 16-18)

Podemos concluir que las células epiteliales pulmonares presentan un aumento de su capacidad de respuesta al estímulo inflamatorio cuando son expuestas a las cepas virales NL4.3 (tropismo CXCR4) y NL4.3 Bal(tropismo CCR5) siendo mayor la respuesta cuando se expone a la cepa viral CXCR4. Las células epiteliales intestinales en forma contraria presentan una disminución de su respuesta al estímulo inflamatorio al estímulo mediado por TNF-alpha. solo cuando son expuestas a la cepa NL4.3BAL(tropismo CCR5).

Hemos demostrado que la capacidad de atraer linfocitos Th17 o neutrófilos es dependiente del tipo de respuesta específica que tienen las células epiteliales para producir quimiocinas en respuesta un estímulo inflamatorio determinado.

Se estudio CCL20 por ser una quimiocina muy importante en la atracción de los

linfocitos Th17 e IL-8 por ser la más importante en la quimioatracción de neutrófilos (Schutyser, Struyf et al.2003). Las células epiteliales intestinales(HT-29) producen altos niveles de IL-8 en respuesta al estímulo de IL-1B concordando con estudios previos(Kwon,Keates et al) y no en respuesta a la estimulación con TNF-alpha en tanto las células epiteliales alveolares(A549) responde bien a ambos estímulos, teniendo una mejor respuesta a la IL-1B. Las células epiteliales intestinales(HT-29) responden bien a TNF-alpha e IL-1B para producir CCL20 mientras que las células epiteliales alveolares(A549) tiene una mejor respuesta a IL-1B respecto a TNF-alpha. Conocer adecuadamente los mecanismos de producción de quimiocinas nos podría permitir más adelante establecer terapias para evitar el reclutamiento deletéreo de células sensibles de infección a compartimientos anatómicos de alta replicación viral como el GALT.

Los linfocitos Th17 son reclutados en los tejidos mucosos mediante la quimiocina CCL20. Estos mediante la producción de IL-17 permiten el aumento en la secreción de esta quimiocina. La IL-17 aumenta la capacidad de producir CCL20 e IL-8 (Aujla, Chan et al. 2008; Pelletier,Maggi et al. 2010). Las células epiteliales intestinales(HT-29) responden muy bien al efecto sinérgico entre TNF-alpha/IL-17 para la producción de CCL20 de acuerdo a nuestros resultados lo cual es compatible con estudios precedentes de Lee et al. en el cual se demostró el aumento de transcritos de CCL20 e IL-8 bajo esta condición. Las células epiteliales alveolares (A549) no son susceptibles al efecto sinérgico entre TNF-alpha e IL-17 en contraposición con los resultados encontrados por Cheng et al. el cual encontró aumento en la producción de transcritos de CCL20. A pesar de que ambos tipos celulares expresan niveles

similares del receptor de IL-17 el efecto sinérgico de IL-17 sobre TNF-alpha solo está presente en las células epiteliales intestinales (HT-29) la razón por la cual las células epiteliales alveolares no responden a este estímulo está aún por determinar. Con estos resultados podemos concluir que el efecto sinérgico entre TNF-alpha e IL-17 es de vital importancia para mantener la homeostasis de la mucosa intestinal y la quimioatracción de linfocitos Th17(Chen, K., J. Huang, et al. 2006).

El efecto sinérgico de TNF-alpha e IL-17 en la quimioatracción de neutrófilos mediada por IL-8 no es tan determinante de acuerdo a nuestros resultados ya que las células epiteliales alveolares carecen de esta sinergia y en las intestinales el efecto se anula al aumentar las dosis de TNF-alpha (Kelly, C. P., S. Keates, et al. 1994).

Estudios anteriores corroboran nuestros resultados sobre la expresión del receptor CD4 y correceptores CXCR4 y CXCR5 en las células epiteliales. Las células epiteliales pulmonares (A549) presentan una muy baja expresión casi indetectable de los 3 receptores (Yadav, Shi et al. 2010) al igual que las células epiteliales intestinales (HT-29) excepto que estas últimas presentan cierta expresión del correceptor CXCR4(Jordan,Kolios et al,1999). La integración viral en las células epiteliales intestinales fue casi indetectable (100 copias/millón de células) acorde con los niveles de expresión de los receptores que hacen susceptibles a las células a la infección, la falta de integración de la cepa viral con tropismo CXCR4 a las células que expresan este correceptor podría ser explicada por la falta de expresión del receptor CD4 o sino por factores de restricción intracelular que evitan la integración del genoma viral.

Asombrosamente en las células epiteliales alveolares (A549) se encontró una tasa integración viral moderada, siendo este a nuestro conocimiento el primer reporte de la capacidad de estas células a poder integrar el genoma viral. El mecanismo por el cual el virus ingresa a estas células podría ser explicado por la expresión de otros receptores de susceptibilidad celular como son la Galactosil-Ceramida(GalCer), glicosfingolípidos de membrana entre otros.(Bomsel and Alfsen 2003). Aun queda pendiente elucidar y validar estos resultados en cultivos primarios de células epiteliales pulmonares humanas.

Se ha demostrado que la exposición directa del VIH-1 a la mucosa epitelial altera su permeabilidad (Nasli et al. 2010) mediada por una disminución de la expresión de las proteínas de unión intercelular (ZO-1, claudina 1,2,4). Con los resultados expuestos demostramos que el virus no solo afecta la integridad anatómica de las mucosas sino también la funcionalidad de las células epiteliales pulmonares y alveolares para producir la quimiocina CCL20 dependiente de la cepa viral a la que fueren expuestas. Esta alteración estaría explicada según nuestros resultados por una alteración en la respuesta a TNF- α ya sea incrementando su respuesta (células epiteliales pulmonares) o disminuyéndola (células epiteliales intestinales).

El aumento en la producción de la quimiocina CCL20 en respuesta al estímulo inflamatorio como resultado de la exposición de las células epiteliales alveolares a ambas cepas virales explicaría el por qué se encontró un mayor número de linfocitos Th17 en la mucosa pulmonar respecto a la mucosa intestinal en pacientes infectados con VIH-1(Brechley et al). Este aumento en la capacidad de respuesta al estímulo inflamatorio podría ser explicado debido a

la susceptibilidad que tienen las células epiteliales alveolares a la infección por VIH-1 lo cual aumentaría su respuesta a TNF-alpha, lo que no estaría claro es si esta respuesta sería dependiente o no de una activación del receptor a IL-17 ya que estas células no responden a la sinergia TNFalpha/IL-17 y muestran un aumento claro en la producción de CCL20 con la exposición a la cepa de tropismo CXCR4 bajo esta condición.

La disminución en la producción de la quimiona CCL20 en las células epiteliales intestinales explicaría porque hay una depleción de estos linfocitos en la mucosa intestinal de pacientes infectados con VIH-1 (Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. 2008; Estes, J. D., L. D. Harris, et al. (2010). La disminución de la presencia de los linfocitos Th17 a nivel intestinal significaría una disminución del estímulo producido sobre las células de la mucosa intestinal en la producción de péptidos antimicrobianos y otras quimiocinas lo cual generaría una alteración en la homeostasis de la flora bacteriana normal permitiendo su proliferación, translocación bacteriana así perpetuando la actividad inmune crónica, un mecanismo importante por el cual el virus establece la infección crónica. Cobra esto aun mayor importancia debido a que este efecto es solo producido por la cepa viral con tropismo CCR5 la cual es transmitida de manera inicial y selectiva durante el contagio por contacto con las mucosas(Grivel, Shattock et al 2011)lo cual agravaría la depleción de los linfocitos Th17 mediada por replicación viral en etapas tempranas de la infección.

El establecimiento de la actividad inmune crónica estaría mediado entonces por mecanismos diferentes y opuestos en la mucosa intestinal y pulmonar. En el

compartimiento intestinal estaría mediado por una falta de control de la flora microbiana comensal por disminución de los linfocitos Th17 y en el compartimiento pulmonar por un aumento de la población de linfocitos Th17 incrementando así el estímulo pro inflamatorio de esta forma corroborando nuestra hipótesis sobre el efecto diferencial que ejerce el virus sobre estas células.

En conclusión el presente estudio demuestra que el VIH-1 produce una alteración funcional directa en las células epiteliales alveolares e intestinales de manera diferencial perpetuando la translocación bacteriana y activación inmune crónica en el compartimiento intestinal y pulmonar. Esta información será importante para el futuro establecimiento de terapias que busquen el control del daño a la mucosa en el contexto de una infección por VIH-1.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS



CONCLUSIONES

Conclusión 1: El VIH-1 tiene un efecto diferencial en las células epiteliales pulmonares e intestinales, disminuyendo la producción de CCL20 en las células epiteliales intestinales en respuesta al estímulo inflamatorio y aumentando su producción en la células epiteliales pulmonares.

Conclusión 2: Existe una mejor respuesta en las células epiteliales pulmonares al estímulo con IL1-beta comparado con TNF-alpha en la producción de CCL20 e IL8.

Conclusión 3: Existe una buena respuesta en las células epiteliales intestinales al estímulo con IL1-beta y TNF-alpha en la producción de CCL20. Las células epiteliales intestinales produjeron IL8 solo en respuesta a TNF-alpha.

Conclusión 4: Las células epiteliales pulmonares no expresaron los receptores CD4,CCR5 y CXCR4.

Conclusión 5: Las células epiteliales intestinales expresaron el receptor CXCR4 mas los receptores CD4 y CCR5.

Conclusión 6: Las células epiteliales pulmonares integraron mayores niveles de la cepa viral NL4.3 comparado con las células epiteliales intestinales.

Conclusión 7: Las células epiteliales pulmonares integraron mayores niveles de la cepa viral NL4.3 Bal comparado con las células epiteliales intestinales.

Sugerencias

Con los resultados preliminares encontrados en el presente estudio se sugiere realizar cultivos primarios de células epiteliales pulmonares e intestinales de pacientes infectados con VIH-1 y estudiar el efecto que este tiene sobre la producción de quimiocinas que atraen linfocitos TH17.



BIBLIOGRAFÍA

1. Ancuta, P., A. Kamat, et al. (2008). "Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients." PLoS One 3(6): e2516.
2. Ancuta, P., P. Monteiro, et al. (2010). "Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS 5(2): 158-165.
3. Bomsel, M. and A. Alfsen (2003). "Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery." Nat Rev Mol Cell Biol 4(1): 57-68.
4. Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "HIV infection and the gastrointestinal immune system." Mucosal Immunol 1(1): 23-30.
5. Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS 3(3): 356-361.
6. Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." Blood 112(7): 2826-2835.
7. Chen, K., J. Huang, et al. (2006). "Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells." J Virol 80(15): 7645-7657.
8. Chomont, N., M. El-Far, et al. (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." Nat Med 15(8): 893-900.
9. Dandekar, S., M. D. George, et al. (2010). "Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier." Curr Opin HIV AIDS 5(2): 173-178.

10. Dann, S. M. and L. Eckmann (2007). "Innate immune defenses in the intestinal tract." *Curr Opin Gastroenterol* 23(2): 115-120.
- de Silva, T. I., M. Cotten, et al. (2008). "HIV-2: the forgotten AIDS virus." *Trends Microbiol* 16(12): 588-595.
11. Doms, R. W. (2001). "Chemokine receptors and HIV entry." *AIDS* 15 Suppl 1: S34-35.
12. Estes, J. D., L. D. Harris, et al. (2010). "Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections." *PLoS Pathog* 6(8).
13. Gosselin, A., P. Monteiro, et al. (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." *J Immunol* 184(3): 1604-1616.
14. Hartupée, J., C. Liu, et al. (2007). "IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization." *J Immunol* 179(6): 4135-4141.
15. Jordan, N. J., G. Kolios, et al. (1999). "Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells." *J Clin Invest* 104(8): 1061-1069.
16. Kelly, C. P., S. Keates, et al. (1994). "IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells." *Am J Physiol* 267(6 Pt 1): G991-997.
17. Kinugasa, T., T. Sakaguchi, et al. (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." *Gastroenterology* 118(6): 1001-1011.

18. Kolls, J. K. and S. A. Khader (2010). "The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity." *Cytokine Growth Factor Rev* 21(6): 443-448.
19. Kwon, J. H., S. Keates, et al. (2002). "Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease." *Gut* 51(6): 818-826.
20. Lederer, S., D. Favre, et al. (2009). "Transcriptional profiling in pathogenic and nonpathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization." *PLoS Pathog* 5(2): e1000296.
21. Lee, J. W., P. Wang, et al. (2008). "Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells." *J Immunol* 181(9): 6536-6545.
22. Monteiro, P., A. Gosselin, et al. (2011). "Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." *J Immunol* 186(8): 4618-4630.
23. Murdoch, C., P. N. Monk, et al. (1999). "Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells." *Immunology* 98(1): 36-41.
24. Nazli, A., O. Chan, et al. (2010). "Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation." *PLoS Pathog* 6(4): e1000852.
25. Pelletier, M., L. Maggi, et al. (2010). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." *Blood* 115(2): 335-343.
26. Starner, T. D., C. K. Barker, et al. (2003). "CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties." *Am J Respir*

Cell Mol Biol 29(5): 627-633. Stevenson, M. (2003). "HIV-1 pathogenesis." Nat Med 9(7): 853-860.

27. Schutyser, E., S. Struyf, et al. (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." Cytokine Growth Factor Rev 14(5): 409-426.



ANEXO 1

PROYECTO DE TESIS



Universidad Católica de Santa María

Facultad de Medicina Humana

Programa Profesional de Medicina
Humana



“Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en
células epiteliales de pulmón e intestino ”

Autor:

TOMAS RAUL WICHE SALINAS

Proyecto de tesis para obtener el título
profesional de Médico Cirujano

Arequipa- Perú

2015

Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

I. PREAMBULO

La infección de VIH-1(virus de la inmunodeficiencia humana tipo1) está asociada a una fuerte depleción de linfocitos T CD4 con una polarización en la depleción de linfocitos Th17 a nivel de la mucosa intestinal. Esto conlleva a una translocación bacteriana que es la causa de la activación inmune crónica y progresión de la enfermedad¹.

Las células epiteliales juegan un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis a nivel de la mucosa intestinal vía el reclutamiento de células de inmunidad innata (neutrófilos) y adaptativa(Th17). Las células Th17 cumplen un doble rol en la infección por VIH. Contribuyen a la defensa del huésped mediante la producción de IL-17 que estimula a las células epiteliales a producir quimiocinas que atraen mas Th17(CCL20) y neutrófilos (B-defensinas) a los tejidos mucosales. Por otra parte cumplen un rol deletéreo ya que son altamente susceptibles a la replicación viral. La frecuencia de linfocitos Th17 se encuentra disminuida en el GALT(tejido linfoide asociado a mucosa intestinal) pero no a nivel pulmonar en pacientes infectados por VIH-1, sugiriendo que existe un mecanismo diferencial en el reclutamiento de estas células en los diferentes compartimientos anatómicos^{1,3,4}.

En el presente estudio evaluó la hipótesis que desea establecer si VIH interfiere en la capacidad funcional de las células epiteliales intestinales y pulmonares de manera diferencial para producir quimiocinas responsables del reclutamiento de linfocitos Th17^{2,4}.

Para ello se exploró la capacidad de las células epiteliales en producir quimiocinas específicas para la atracción de linfocitos Th17(CCL20) y

neutrófilos (IL-8), la permisividad de las células epiteliales pulmonares y alveolares a la infección por VIH-1 in vitro y el impacto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas específicas para la quimiotaxis de células Th17 por las células epiteliales intestinales y alveolares^{4,5}.

El VIH-1 se sigue esparciendo por el mundo de una forma heterogénea. Si bien la mortalidad ha disminuido con el establecimiento de la terapia antirretroviral es necesario el planteamiento de terapias coadyuvante que busquen la erradicación del virus de las células humanas, en ello se justifica conocer la patogénesis del VIH-1 sobre las células epiteliales.



PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1. Problema de Investigación

Enunciado del problema

¿Cuál es el Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino?

Descripción del Problema

a. Área del Conocimiento

Campo: Ciencias de la salud

Área: Medicina Humana

Especialidad: Inmunología e Infectología

Línea: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Análisis u Operacionalización de variables

VARIABLE	INDICADOR	VALOR	TIPO Y ESCALA
Estimulación con TNF-alpha	Cantidad de TNF-alpha	1,10,100 ng/ml	Categórica Nominal
Estimulación con LPS	Cantidad de LPS	1,10,100 ng/ml	Categórica Nominal
Estimulación con IL1-beta	Cantidad de IL1-beta	1,10,100 ng/ml	Categórica Nominal
Estimulación con IL-17	Cantidad de IL-17	1,10,100 ng/ml	Categórica Nominal
Niveles de CCL20	ELISA	pg/ml	Numérica Continua
Niveles de IL-8	ELISA	Pg/ml	Numérica Continua
ADN proviral integrado	PCR Tiempo-Real	ADN proviral/10e6 células	Numérica Continua
Expresión del receptor CD4	Citometría de flujo	Número de células/10e6 células	Numérica Continua
Expresión del receptor CCR5	Citometría de flujo	Número de células/10e6 células	Numérica Continua
Expresión del receptor CXCR4	Citometría de flujo	Número de células/10e6 células	Numérica Continua
Expresión del receptor EPCAM	Citometría de flujo	Número de células/10e6 células	Numérica Continua

b. Interrogantes Básicas:

1. ¿Cuáles son los niveles de CLL20 e IL-8 producidos por las células epiteliales pulmonares posterior a la estimulación con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS ?
2. ¿ Cuáles son los niveles de CLL20 e IL-8 producidos por las células epiteliales intestinales posterior a la estimulación con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS?
3. ¿Cuál es nivel de expresión de los receptores CD4,CCR5,CXCR4 y EPCAM en las células epiteliales pulmonares?
4. ¿Cuál es nivel de expresión de los receptores CD4,CCR5,CXCR4 y EPCAM en las células epiteliales intestinales?
5. ¿Cuál es nivel de ADN proviral integrado por las células epiteliales intestinales?
6. ¿Cuál es nivel de ADN proviral integrado por las células epiteliales pulmonares?
7. ¿Cuál es el efecto de la infección con diferentes cepas de VIH-1 en las células epiteliales intestinales y pulmonares sobre la producción de CLL20 e IL-8 posterior a la estimulación con TNF-alpha e IL-17?

c. Tipo de Investigación: Experimental

d. Nivel de Investigación: Experimental

Justificación del Problema:

El VIH-1 y su estado terminal conocido como Síndrome de inmunodeficiencia Humana ha producido uno de los mayores cambios en la salud pública mundial desde su descubrimiento. Alrededor de 30 a 40 millones de personas viven infectadas y 25 millones ya fallecieron. Actualmente no está totalmente elucidada la patogénesis de esta infección y el efecto que tiene sobre el sistema inmune del ser humano. Se ha demostrado que la infección causada por el VIH-1 tiene un efecto directo sobre el tejido linfóide asociado a mucosas siendo más específicos de manera preferencial sobre el tejido linfóide de la mucosa intestinal. Es por ello que determinar los mecanismos de patogénesis

del VIH-1 en los diferentes tipos de tejidos linfoides asociados a mucosas ayudara a poder establecer terapias coadyuvantes al tratamiento actual. Por tal motivo el objetivo del presente estudio es determinar el efecto que tiene VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino.

Relevancia Social y Contemporánea:

Han pasado ya más de tres décadas desde que se reconoció esta enfermedad y el VIH-1 se sigue esparciendo por el mundo de una forma heterogénea. En un inicio estuvo localizado principalmente en América del norte, oeste de Europa y África subsahariana pero al momento está presente en todos los continentes y es un problema de salud pública global. Si bien la mortalidad ha disminuido con el establecimiento de la terapia antirretroviral es necesario el planteamiento de terapias coadyuvantes que busquen la erradicación del virus de las células humanas, en ello radica la importancia de conocer la patogénesis del VIH-1 sobre las células epiteliales.

Relevancia Científica y Académica:

El presente estudio tiene relevancia científica y académica ya que planteará un nuevo mecanismo de la patogénesis del VIH-1 sobre las células epiteliales pulmonares y alveolares y abrirá la puerta a la realización de nuevos estudios clínicos relacionados al tema.

Originalidad: No existe ningún trabajo de características similares en nuestro medio local.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Virus de la inmunodeficiencia humana

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un lentivirus (de la familia Retroviridae), causante del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida). Fue descubierto y considerado como el agente de la naciente epidemia de sida por el equipo de Luc Montagnier en Francia en 1983. El virión es esférico, dotado de una envoltura y con una cápside proteica. Su genoma es una cadena de ARN monocatenario que debe copiarse provisionalmente al ADN para poder multiplicarse e integrarse en el genoma de la célula que infecta. Los antígenos proteicos de la envoltura exterior se acoplan de forma específica con proteínas de la membrana de las células infectables, especialmente de los linfocitos T CD4¹.

2.2. Categorización

El virus de inmunodeficiencia humana forma parte del género Lentivirus. Estos constituyen un grupo dentro de la familia Retroviridae. Los virus de este grupo poseen propiedades morfológicas y biológicas comunes. Varias especies son atacadas por los lentivirus, cuya característica principal consiste en un período de incubación prolongado que desemboca en enfermedad después de varios años^{2,4}.

Desde su ingreso en la célula hospedadora, la cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) viral comienza su transformación en una doble cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) por acción de la enzima transcriptasa inversa que forma parte del virus. La integrasa y otros cofactores actúan para que el ADN del virus se fusione con el ADN de la célula hospedadora⁴ a través de la transcripción en el genoma de la célula que aloja al virus. De esta manera, la célula queda infectada por el virus. Después de este proceso, los lentivirus reaccionan de dos maneras posibles: puede ocurrir que el virus entre en latencia mientras la célula infectada continúa en funciones, o bien, que el virus comience a replicarse activamente y libere viriones capaces de infectar otras células^{2,4}.

Existen dos tipos del VIH, llamados VIH-1 y VIH-2. El primero de ellos corresponde al virus descubierto originalmente, que recibió los nombres de LAV y HTLV-III por parte de los dos equipos que estaban investigando el agente etiológico del sida durante la primera mitad de la década de 1980. El VIH-1 es más virulento e infeccioso que el VIH-2 y es el causante de la mayoría de infecciones por VIH en el mundo. El VIH-2 es menos infeccioso y por ello se encuentra confinado casi exclusivamente a los países de África occidental⁵.

2.3. Estructura del VIH

El VIH comparte con los retrovirus las características esenciales de esa familia. El virión contiene información genética bajo la forma de ácido ribonucleico (ARN), protegido por una envoltura de membrana. Los retrovirus insertan su información genética en las células hospedadora por acción de la transcriptasa inversa^{5,6}.

Un virión del VIH tiene una forma aproximadamente esférica con un diámetro de 80-100 nm. Está constituido por tres capas. La exterior es una bicapa lipídica. Posee 72 prolongaciones formadas por las glicoproteínas gp120 y gp41 que actúan en el momento de la unión del virus a la célula hospedadora. La capa intermedia está constituida por la nucleocápside icosaédrica. La capa interior tiene forma de un cono truncado. Está constituida por el ARN viral y la nucleoproteína. La cadena genética del VIH está constituida por un ARN de cadena simple compuesto por dos filamentos idénticos. El ARN contiene varios genes, cada uno de los cuales codifica las diversas proteínas que el VIH necesita para reproducirse^{5,6}.

2.4. Genoma del VIH-1.

Los genomas del VIH-1 y VIH-2 son muy similares. Ambos están compuestos por los tres genes básicos de la familia de los retrovirus. Se trata de los genes gag, pol y env. Cada uno de estos genes codifica proteínas que ayudan a la reproducción

del virus. El genoma del VIH posee otros seis genes adicionales: tat, rev, vpu (vp_x en el caso del VIH-2), vif y nef^{7,8}.

2.5. Genes estructurales

Las proteínas estructurales son codificadas por los genes gag, pol y env, y su secuencia cubre la mayor parte del genoma viral, quedando sólo una parte menor para el resto de los genes. El gen gag es traducido a una proteína precursora, la p55, que luego se asocia, durante la gemación por la que se liberan nuevas partículas víricas desde de la célula infectada, a dos copias del ARN viral, para el que presenta una región afín, y a otras proteínas virales y celulares. Una proteasa, producto del gen pol corta durante la maduración del virión la p55 en cuatro proteínas que se incorporan a sus lugares respectivos¹⁰:

- La proteína p24 forma la cápside.
- La proteína p17 constituye la matriz, situada bajo la envoltura, a la que estabiliza. Una parte de las proteínas se unen al complejo molecular que acompaña al ADN viral al interior del núcleo. En la superficie de la proteína existe una región cariofílica (literalmente afín al núcleo) que es reconocida por la maquinaria molecular de importación nuclear. Éste es el mecanismo que permite al VIH infectar células diferenciadas, no destinadas a dividirse, algo que no ocurre en ningún otro retrovirus¹⁰.
- Las proteínas p6 y p7 (ó p9) forman la nucleocápside. La región de la p55 correspondiente al polipéptido p6 es responsable de la incorporación de la proteína accesoria Vpr (producto de la traducción del gen vpr) al virión en formación y de la interacción con la membrana de la célula que hace posible la gemación. La p7 (p9) es responsable del reconocimiento y la incorporación del ARN al virión y además interviene en la transcripción inversa facilitándola⁸.

Dentro de la cápside, además de las dos copias idénticas del ARN viral hay ejemplares de tres enzimas necesarias para la multiplicación del virus: una transcriptasa inversa, una integrasa y una proteasa. Estas enzimas, así como una ARNasa se producen a partir de la proteína Pol, después del corte de una proteína precursora mixta derivada de la cotraducción, una de cada 20 veces, de los genes gag y pol. La propia proteasa vírica rompe la proteína anterior, con una eficiencia limitada, para obtener las proteínas Gag (p55) y Pol. Luego la proteína precursora Pol es cortada a su vez para formar las cuatro proteínas funcionales citadas⁸:

- La proteasa (p10). Se trata de una aspartil-proteasa cuya forma funcional es un dímero del que se conoce la estructura tridimensional. Actúa cortando las piezas de las proteínas Gag, Pol y de la Gag-Pol. Una parte de los fármacos empleados contra el VIH son inhibidores de su función¹⁰.
- La transcriptasa inversa (p50) cuya función es la síntesis del ADN de doble cadena del provirus usando como patrón la cadena singular del ARN viral. Es una ADN-polimerasa que puede actuar como dependiente del ADN tanto como del ARN. Una vez formada la primera cadena de ADN, complementaria del ARN viral, la ARNasa lo separa de él, lo que permite a la transcriptasa inversa ejecutar la

síntesis de la segunda cadena de ADN tomando como molde la primera que se formó. Así pues, para la síntesis de la primera cadena la actividad de la transcriptasa inversa es ARN-dependiente, pero para la de la segunda es ADN-dependiente. También existen múltiples fármacos contra la actividad de la transcriptasa inversa¹².

- La ARNasa (p15), que como se ha dicho separa las cadenas de ARN de las de la ADN durante la transcripción inversa.
- La integrasa (p31) realiza la inserción del ADN proviral en el genoma de la célula huésped. No se requiere ATP para su actividad y debe cumplir sucesivamente tres funciones:
- Con una actividad exonucleasa corta dos nucleótidos del extremo 3' de cada una de las dos cadenas del ADN proviral.
- Con una actividad endonucleasa (de doble cadena) corta el ADN del huésped en el punto de integración. No hay un lugar fijo en el genoma para que esto se realice, sino que ocurre en cualquier región muy accesible de la cromatina, lo que se supone que favorece la expresión del provirus, al coincidir esas regiones del genoma con las más transcritas.
- Por último, con una actividad ligasa el ADN proviral es soldado, mediante sólo un enlace covalente en cada extremo, en el ADN celular.

En la actualidad existe un fármaco comercializado contra la actividad de la integrasa, el raltegravir.

La envoltura se basa en una bicapa lipídica, lo mismo que cualquier membrana biológica, y sus componentes estructurales básicos proceden de la membrana plasmática de la célula parasitada. Pero la envoltura porta además regularmente espaciadas 72 espículas, que son complejos proteicos integrados en la membrana formados por proteínas virales codificadas por el gen env. Cada espícula está formada por una pieza de la proteína gp41, integral en la membrana, y una cabeza externa formada por la proteína gp120, esencial para el acoplamiento con el exterior de ciertas células previo a su invasión. Entre los dos componentes de las espículas existe una unión no covalente. Las proteínas gp41 y gp120 se sintetizan como una sola poliproteína, gp160, con la información del gen env antes de que sea cortada por una proteasa de la célula. La proteína Env existe como trímero en la superficie de los viriones y las células infectadas¹².

Los fármacos inhibidores de la fusión funcionan contra la proteína gp41, para evitar su unión a los linfocitos.

Proteínas reguladoras

Tat

La proteína Tat existe en dos formas, una larga, de 101 restos aminoácidos de longitud, y otra más corta, de sólo 72. La segunda se produce cuando en fase temprana se produce una edición completa del ARNm viral, la primera cuando en

una fase más tardía sólo se realiza una edición parcial. La proteína Tat (portransactivador) es imprescindible para la producción de nuevos viriones, que promueve activamente. La proteína se une a una región de 59 nucleótidos situada en el extremo 5' del ARN viral llamada TAR (Transactivator Active Region) y actúa como un transactivador, algo excepcional, puesto que éstos suelen unirse al ADN, no al ARN. En cuanto este extremo inicial del genoma viral ha sido transcrito desde el ADN proviral, la proteína Tat se une a él y promueve su elongación favoreciendo la transcripción del resto de la cadena¹³.

Rev

La proteína rev regula la expresión del ARN viral controlando el ritmo de exportación del ARNm.

Tat y Rev: acción conjunta

La acción sinérgica de Tat y Rev fuertemente incrementa la expresión de proteínas virales. Los papeles que Tat y Rev desempeñan en la regulación transcripcional del VIH-1 y en la expresión de proteínas estructurales, respectivamente, hacen Tat y Rev esenciales para el ciclo de vida del VIH. Sus funciones facilitan la expresión de proteínas virales en dos etapas. Después de la integración del ADN proviral y de su transcripción en un nivel basal, solamente los RNAs de 2 KB se transportan al citoplasma. Esto permite la síntesis de Tat, Rev y de Nef. Tat y Rev entonces son transportadas al núcleo, donde actúan para aumentar la transcripción del ADN del provirus (Tat) y del transporte de todos los RNAs virales al citoplasma (Rev). La expresión de proteínas codificada por las clases de RNA de 9 KB y 4 KB (Gag, Gag-Pol, Env, Vpr, Vif, y de Vpu) puede entonces ocurrir. Estudios donde se han mutado genes virales han determinado que Vif, Vpr, Vpu y Nef no son esenciales para la producción de partículas infecciosas en cultivos celulares "in-vitro". Sin embargo, la conservación de dichas proteínas accesorias en el genoma del VIH sugiere que todas desempeñan papeles importantes durante el ciclo infeccioso en el huésped. Los roles de estas proteínas serán descritos a continuación¹³.

Proteínas accesorias

Vif: incremento en infectividad y protección del genoma viral

Vif es una proteína de 193 aminoácidos que está presente en bajos niveles dentro de los viriones, e interactúa con el RNA genómico viral. La división de esta proteína reduce la infectividad del VIH-1 en cultivos celulares y en modelos animales de patogénesis. No obstante, el mecanismo de acción de Vif se ha empezado a entender recientemente. La ausencia de Vif en partículas infecciosas no puede ser compensada con la expresión de Vif en las células infectadas. Estudios recientes han demostrado que Vif es requerida para eliminar la acción del factor ApoBEC3G, la cual es una deaminasa de citidinas, que convierte la citosina en uracilo, y emplea como sustrato el ADN de cadena sencilla. Además, esta enzima posiblemente actúa durante el ciclo de la transcriptasa inversa, modificando así la cadena negativa del DNA, porque esta es la fase en la cual el

ADN de cadena sencilla está disponible. ApoBEC3G es selectivamente incorporada dentro de las partículas de VIH, resultando en un alto nivel de mutaciones en el genoma viral. Dado que estos altos niveles de mutación son perjudiciales para la viabilidad del virus, VIH ha evolucionado una estrategia para abolir esta poderosa barrera. Sin embargo, estudios recientes sugieren que ApoBEC3G no requiere su acción enzimática para tener efecto. Estudios más recientes han implicado que ApoBEC3G tiene un rol en la inhibición de ciertas fases en el ciclo de la transcriptasa inversa¹⁵.

Vpu: facilita el desprendimiento de viriones en células infectadas

Vpu es una proteína de 81 aminoácidos que es insertada en membranas vía su terminal nitrogenado. Vpu se acumula en el aparato de Golgi y en endosomas celulares. Vpu es única en HIV-1 y no hay homólogos en lentivirus relacionados como el VIH-2 y el VIS. A Vpu se le han atribuido dos actividades¹⁵.

Degradación de la proteína CD4

En la ausencia de Vpu, la proteína CD4 interactúa con la proteína viral gp160 recién sintetizada para formar un complejo insoluble, el cual retiene gp120 dentro de la célula. La región citoplásmica de Vpu se puede unir con CD4 y con la proteína β -TrCP. Esto induce la ubiquitinización de CD4 y su subsiguiente degradación por el proteasoma, incrementando así la expresión de gp120 en la superficie celular¹⁵.

Realza en el desprendimiento de viriones de la membrana celular

Esta actividad depende de la región transmembranal de Vpu. En la ausencia de Vpu, los viriones se acumulan en la superficie celular en un estado parcialmente desprendido. Expresión de Vpu resulta en la liberación facilitada de viriones de la membrana celular. Remarcablemente, este efecto no está restringido solamente al VIH-1; Vpu también facilita el desprendimiento de otros virus no relacionados. El mecanismo por el cual esto ocurre es desconocido. Se ha sugerido que Vpu facilita la fluidez de la membrana celular por medio de un canal de cationes. También se ha sugerido que Vpu causa disrupción de interacciones entre proteínas del VIH y de la superficie celular; esto previene la endocitosis de viriones recientemente desprendidos de la célula¹⁶.

Ciclo de vida

Enlace y fusión: El VIH empieza su ciclo de vida cuando se liga a un receptor CD4 y a uno de dos co-receptores en la superficie de un linfocito T CD4 + . Luego el virus se fusiona con la célula anfitriona. Después de la fusión, el virus libera el ARN, su material genético, dentro de la célula anfitriona. Transcripción inversa: Una enzima del VIH, conocida como transcriptasa inversa convierte la cadena simple del ARN vírico en cadena doble de ADN vírico. Integración: El nuevo ADN del VIH que se forma entra al núcleo de la célula anfitriona, donde una enzima del VIH llamada integrasa "esconde" el ADN vírico dentro del propio ADN de la célula anfitriona. El ADN del VIH integrado se llama provirus. El provirus puede permanecer inactivo por varios años sin producir nuevas copias del VIH o

produciendo muy pocas. Transcripción: Cuando la célula anfitriona recibe señal para volverse activa, el provirus usa una enzima anfitriona llamada polimerasa del ARN para crear copias del material genómico del VIH y segmentos más cortos del ARN conocidos como ARN mensajero (ARNm). El ARNm se utiliza como modelo o patrón para la formación de cadenas largas de proteínas del VIH. Ensamblaje: La enzima del VIH llamada proteasa divide las cadenas largas de proteínas del VIH en pequeñas proteínas individuales. A medida que las proteínas pequeñas del VIH se unen a las copias del material genético del ARN del VIH, se ensambla una nueva partícula del virus. Gemación: El nuevo virus ensamblado "brota" de la célula anfitriona. Durante la gemación, el nuevo virus acapara parte de la envoltura exterior de la célula. A esta envoltura, que actúa como recubrimiento, le brotan combinaciones de proteína y azúcar, conocidas como glucoproteínas del VIH. Estas glucoproteínas del VIH son necesarias para que el virus se ligue al CD4 y a los co-receptores. Las nuevas copias del VIH pueden ahora pasar a infectar a otras células¹⁷.

Ciclo de replicación

Las células que el VIH invade son esencialmente los linfocitos T CD4+, pero también en menor medida los monocitos/macrófagos, las células dendríticas, las células de Langerhans y las células de microglía del cerebro. La replicación viral tiene pues lugar en tejidos diversos (de ganglios linfáticos, intestino, cerebro, timo). Los órganos linfoides, sobre todo los ganglios linfáticos, constituyen la principal sede de su replicación. El virus está presente en numerosos líquidos del organismo, en particular la sangre y las secreciones genitales¹⁷.

La replicación del virus se desarrolla en las siguientes etapas:

La fijación: representa la primera etapa en la invasión de una célula. Se basa en el reconocimiento mutuo y acoplamiento de proteínas de la envoltura del virión, las gp120 y gp41, y los receptores de la célula blanca, los CD4. Este reconocimiento no es posible sin ayuda de correceptores propios de las células susceptibles de ser invadidas; en el caso de los macrófagos son los CCR5 y en el caso de los LT4, los CXCR4, que interactúan con la proteína superficial. Macrófagos y LT4 tienen en común su principal receptor: el receptor CD4. Este reconocimiento es condición obligada para que el virus llegue a penetrar en la célula y continuar con el proceso de infección¹⁸.

La penetración: es el segundo paso, una vez reconocido el virión por los receptores de superficie, se vacía dentro de la célula fusionándose la envoltura lipídica del virión con la membrana plasmática de la célula. Protegidos por la cápside y las nucleocápsides, los dos ARN mensajeros que forman el genoma viral y sus proteínas asociadas se encuentran ahora en el citoplasma. Luego ocurre la eliminación de las cubiertas proteicas, cápside y nucleocápsides, quedando el ARN vírico libre en el citoplasma y listo para ser procesado¹⁸.

La transcripción inversa del ARN vírico para formar ADNc (ADN complementario, monocatenario) con la misma información: Cada una de las dos moléculas de ARN llega desde el virión asociada a una molécula de transcriptasa inversa que se

ocupa del proceso. Las dos moléculas de ADNc se asocian para formar una molécula de ADN, que es la forma química de guardar la información que una célula eucariota es capaz de procesar¹⁹.

Integración del genoma vírico en el genoma de la célula huésped: Para ello penetra en el núcleo y se inserta en el ADN celular con ayuda de una integrasa, que procede del virión infectante.

La transcripción del ADN vírico por los mecanismos normales de la célula: El resultado de la transcripción es un ARNm (ARN mensajero). El ARNm obtenido es complejo, constituido por una sucesión de intrones (partes no informativas) y exones (partes informativas). Debe ser procesado por cortes y reempalmes antes de que la información que contiene pueda servir para fabricar las proteínas correspondientes. Una vez procesado, el ARNm puede salir del núcleo a través de los poros nucleares¹⁸.

Traducción: Una vez en el citoplasma el ARNm proporciona la información para la traducción, es decir, la síntesis de proteínas, que es realizada a través del aparato molecular correspondiente, del que forman la parte fundamental los ribosomas. El resultado de la traducción no consiste inmediatamente en proteínas funcionales, sino en poliproteínas que aún deben ser cortadas en fragmentos. Por acción de peptidasas específicas del VIH, las poliproteínas producto de la traducción son procesadas, cortándolas, para formar las proteínas constitutivas del virus. Las proteínas víricas fabricadas se ensamblan, junto con ARN provirales, para formar los componentes internos de la estructura del virión, los que constituyen la cápside y su contenido¹⁸.

Gemación: El último paso, ocurre cuando los nucleoides víricos se aproximan a la membrana plasmática y se hacen envolver en una verruga que termina por desprenderse, formando un nuevo virión o partícula infectante. En cada célula infectada se ensamblan varios miles de nuevos viriones, aunque muchos son incompletos y no pueden infectar¹⁸.

Vías de transmisión del virus

El VIH sólo se puede transmitir a través del contacto entre fluidos corporales que poseen una alta concentración viral. El virus no se transmite de manera casual. De acuerdo con los CDC (Centros para el control y la prevención de enfermedades) de Estados Unidos, no se han encontrado casos en que abrazos, besos secos o saludos con las manos hayan sido causantes de infección.¹⁹ El virus ha sido aislado en la saliva, las lágrimas, la orina, el semen, el líquido preseminal, los fluidos vaginales, el líquido amniótico, la leche materna, el líquido cefalorraquídeo y la sangre, entre otros fluidos corporales humanos¹⁹.

Las tres principales formas de transmisión son:

- Sexual (contacto sexual sin protección). (infección de transmisión sexual). La transmisión se produce por el contacto de secreciones infectadas con la mucosa genital, rectal u oral de la otra persona.

- Sanguínea (por sangre). Es una forma de transmisión a través de jeringuillas contaminadas que se da por la utilización de drogas intravenosas o a través de los servicios sanitarios, como ha ocurrido a veces en países pobres, no usan las mejores medidas de higiene; también en personas, como hemofílicos, que han recibido una transfusión de sangre contaminada o productos contaminados derivados de la sangre; y en menor grado trabajadores de salud que estén expuestos a la infección en un accidente de trabajo como puede ocurrir si una herida entra en contacto con sangre contaminada; también durante la realización de piercings, tatuajes y escarificaciones¹⁹.
- Perinatal (de madre a hijo). La transmisión puede ocurrir durante las últimas semanas del embarazo, durante el parto, o al amamantar al bebé. De estas situaciones, el parto es la más problemática. Actualmente en países desarrollados la transmisión vertical del VIH está totalmente controlada (siempre que la madre sepa que es portadora del virus) ya que desde el inicio del embarazo (y en ciertos casos con anterioridad incluso) se le da a la embarazada un Tratamiento Anti-Retroviral de Gran Actividad (TARGA) especialmente indicado para estas situaciones, el parto se realiza por cesárea generalmente, se suprime la producción de leche, y con ello la lactancia, e incluso se da tratamiento antiviral al recién nacido²⁰.

Profilaxis de emergencia

Si una persona contrae el VIH debido a alguna circunstancia imprevista (la penetración de una aguja en un laboratorio, una violación o un condón que se rompe durante el coito), puede aplicarse entonces lo que se conoce como tratamiento profilaxis post-exposición para el VIH. Este es un régimen de medicamentos muy potentes contra el VIH que pueden aplicarse en la hora siguiente al incidente y que siguen ejerciendo su efecto durante las primeras 72 horas (su eficacia va disminuyendo con cada hora transcurrida desde el evento). Este tratamiento puede evitar que la persona se vuelva seropositiva al VIH²¹.

Historia natural de la infección por VIH.

La infección por VIH se presenta en diversas etapas, identificadas por un conjunto de síntomas e indicadores clínicos. En ausencia de un tratamiento adecuado, el virus se replica constantemente e infecta los linfocitos T-CD4, que constituyen una parte esencial del sistema inmunológico en los seres humanos. Por su parte, el sistema inmunológico del portador del VIH reacciona ante la presencia del virus y genera una respuesta que puede mantener la infección bajo control al menos por un tiempo, mediante la reposición de células defensivas. Al término de un período que se puede prolongar por varios años, el VIH se vuelve resistente a las defensas naturales del cuerpo y destruye el sistema inmune del portador. De esta manera, la persona seropositiva queda expuesta a diversas enfermedades oportunistas y puede fallecer.

El estadio de la enfermedad y su pronóstico o el efecto de una terapia antiviral con antiretrovirales se mide bien con una combinación de dos parámetros:

- Población de linfocitos T CD4/ml. Se determina mediante citometría de flujo.
- Cuantificación de la carga viral (copias/ml), mediante PCR cuantitativa .

Fase aguda

La fase de la infección aguda por VIH inicia en el momento de la infección. El virus se propaga por el cuerpo de la persona infectada a través de sus fluidos corporales. En un plazo de días, el VIH infecta no sólo las células expuestas inicialmente (por ejemplo, las células de la mucosa vaginal o rectal en el caso de una infección por vía sexual) sino también los ganglios linfáticos. Durante ese tiempo, el VIH se multiplica dentro del organismo hasta alcanzar niveles propios de la infección crónica. El tejido linfoide asociado a los intestinos constituye uno de los principales espacios del cuerpo humano donde tiene lugar la reproducción inicial del VIH por su alto porcentaje de linfocitos T CD4. Un porcentaje importante de personas que contraen el virus no presenta síntomas de la infección en su fase aguda. Es decir, son pacientes asintomáticos. Sin embargo, se calcula que entre el 40/50%-90% o hasta el 80% de los casos de infección con VIH-1 presentan manifestaciones clínicas. El cuadro de la infección aguda es similar al de una mononucleosis infecciosa: fiebre, malestares musculares, inflamación de los ganglios, sudoración nocturna, diarrea, náuseas y vómito. La gran mayoría de los seropositivos no reciben diagnóstico del cuadro agudo de la infección por VIH, pues son síntomas compartidos por varias enfermedades. Por lo tanto, presentar un conjunto de síntomas como el descrito aquí no es indicador necesario de que una persona se haya infectado por VIH, aunque es recomendable que quien considere que ha estado expuesto a la transmisión y presente los síntomas, acuda a un especialista para recibir atención médica. El cuadro de la infección aguda por VIH aparece entre dos y seis semanas después de la exposición al virus, y desaparece unos pocos días después²¹.

El VIH ataca principalmente los linfocitos T CD4+, que forman parte del sistema inmune de los seres humanos. Aunque estas células por sí mismas no tienen una función de ataque contra células extrañas al cuerpo, tienen un papel importante en la respuesta inmunológica adaptativa. En una persona con buena salud, el número de linfocitos T CD4+ oscila entre 1200 y 500/ μ l. Durante la fase asintomática de la infección, la proporción de linfocitos infectados 1/1000-1/100 000, que aumentará progresivamente hasta llegar a 1/100 en la infección crónica. Durante la fase aguda de la infección, las pruebas tradicionales siempre darán negativo porque no detectan directamente el VIH, sino los anticuerpos producidos como respuesta por el sistema inmune, lo que ocurre alrededor de la 12a semana después de la exposición. En contraste, las pruebas de carga viral, que contabilizan el número de copias del ARN del virus en la sangre, arrojarán como resultado una elevada cantidad de copias del VIH durante la fase aguda de la infección²¹.

Fase crónica

La fase crónica de la infección por VIH se suele llamar también latencia clínica porque el portador es asintomático, es decir, no presenta síntomas que puedan asociarse con la infección. Esto no quiere decir que el virus se encuentre inactivo.

Por el contrario, durante la fase crónica el VIH se multiplica incesantemente. Se calcula que, en un sujeto infectado, diariamente se producen entre mil y diez mil millones de nuevas partículas virales y son destruidos alrededor de cien millones de linfocitos T CD4. Los pacientes son asintomáticos gracias a que el sistema inmune tiene una gran capacidad para regenerar las células destruidas por el virus, pero pueden presentar adenopatías y la disminución del conteo de plaquetas en la sangre²¹.

La reacción ante la presencia del virus termina por desgastar al sistema inmunológico. En ausencia de tratamiento, la mayoría de los portadores del virus desarrollan el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) en un plazo de 5 a 10 años. La causa de esto es que, mientras el virus sigue reproduciéndose de manera constante y aumenta la carga viral en su anfitrión, disminuye también la capacidad de recuperación del sistema inmune. Al término fase crónica, los pacientes desarrollan otras manifestaciones de la infección como dermatitis seborréica, úlceras bucales y foliculitis²¹.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

Principales síntomas del sida

El sida constituye la etapa crítica de la infección por VIH. En esta fase de la infección, el portador del VIH posee un sistema inmunológico que probablemente sea incapaz de reponer los linfocitos T CD4+ que pierde bajo el ataque del VIH y también ha visto reducida su capacidad citotóxica hacia el virus. Este fenómeno coincide con el aumento en las tasas de replicación del virus, que merma la capacidad de reacción del anfitrión ante otros agentes causantes de enfermedades. De esta manera, el portador del virus es presa potencial de numerosas infecciones oportunistas que le pueden conducir a la muerte. La neumonía por *P. jiroveci*, el sarcoma de Kaposi, la tuberculosis, la candidiasis y la infección por citomegalovirus son algunas de las infecciones más frecuentes que atacan a los seropositivos que han desarrollado sida²¹.

La mayoría de los pacientes que han desarrollado sida no sobreviven más de tres años sin recibir tratamiento antirretroviral. Sin embargo, incluso en esta fase crítica el sida y el VIH pueden ser controlados mediante la terapia antirretroviral de gran actividad. Los antirretrovirales pueden brindar una mejor calidad de vida a un portador del VIH y aumentan sus posibilidades de supervivencia. Dado que el VIH tiene una gran capacidad de mutación, con el tiempo los antirretrovirales pierden su efectividad porque el virus desarrolla resistencia a ellos. Una vez que esto ocurre, el paciente queda expuesto nuevamente a las infecciones oportunistas y, eventualmente, a la muerte, en tanto que no se dispone de un medicamento que cure la infección por VIH²¹.

Historia

Origen y evolución

El VIH-1 está relacionado con el SIVcpz que ataca a los chimpancés.

Como otros agentes causantes de enfermedades infecciosas emergentes, el VIH pasó a los seres humanos por zoonosis, es decir por transmisión desde otras especies. La emergencia del sida y la identificación del VIH estimularon investigaciones que han permitido determinar que las variantes del VIH forman parte de un amplio grupo de lentivirus. El VIH es sumamente parecido a un virus que ataca a otros primates. Se trata del virus de inmunodeficiencia de los simios (Simian immunodeficiency virus, SIV), del que se conocen diversas cepas se transmiten por vía sexual. A diferencia del VIH, el virus de los primates no causa inmunodeficiencia en los organismos que lo hospedan, salvo en el caso del salto de una especie a otra²².

El VIH-1, responsable de la actual pandemia, ha resultado estar estrechamente relacionado con el SIVcpz, que infecta a poblaciones de la subespecie centroafricana del chimpancé común (*Pan troglodytes troglodytes*). El SIVcpz, a su vez, parece derivar por recombinación (un fenómeno que se produce fácilmente cuando infectan al mismo individuo dos cepas víricas diferentes) del SIVrcm, propio del mangabey de collar (*Cercocebus torquatus*), y del SIVgsn, propio del avoem (*Cercopithecus nictitans*). Esta hipótesis es sostenida por el hecho de que tanto el VIH como las diversas cepas del SIV poseen el gen *vpu*, además de que se han reportado transmisiones por SIV entre humanos en África ecuatorial. Las distribuciones actuales de las especies implicadas se solapan, y de los chimpancés se sabe que cazan monos pequeños para comerlos, lo que habría facilitado la coinfección por cepas diversas de SIV. La subespecie oriental del chimpancé, *Pan troglodytes schweinfurthi*, presenta también infección con una cepa propia del SIVcpz, pero genéticamente alejada del clado formado por el VIH-1 y las cepas de *P.t.troglodytes*. No se ha encontrado presencia del SIVcpz en la subespecie occidental, *P. t. verus*, aunque se observó la infección en cautividad de un individuo de esta subespecie²².

El salto de la barrera de especie desde *P. t. troglodytes* a *Homo sapiens sapiens* se ha producido al menos tres veces, con variantes del VIH-1 que demuestran parentesco con distintas cepas, geográficamente más o menos localizadas, del SIVcpz. Así pues, el VIH-1 es un virus polifilético. El grupo M del VIH-1, responsable de la pandemia actual, debió pasar a los seres humanos en la primera mitad del siglo XX. Los grupos O y N del VIH-1 están restringidos a África Occidental ecuatorial, con el grupo N presente sólo en Camerún. Con los datos actuales, parece claro que *Pan troglodytes troglodytes* es el reservorio desde el que se han producido repetidamente las infecciones humanas por los virus de cuya evolución procede el VIH-1²².

A su vez el VIH-2, extendido en África Occidental, procede del SIVsm, propio del mangabeye fuliginoso (*Cercocebus atys atys*), que habita las selvas costeras desde Senegal hasta Costa de Marfil. El análisis filogenético muestra que el paso a los seres humanos ha ocurrido también varias veces²².

Los SIV identificados hasta ahora se encuentran, de forma específica y es en África donde parece tener su origen evolutivo este grupo monofilético de virus, genéticamente bien delimitado del resto de los lentivirus. La prevalencia (frecuencia de la infección) es variable entre especies y poblaciones, aunque no

superior al 30%, en las poblaciones afectadas de chimpancés, pero puede pasar del 50% en poblaciones de otros primates, como *Cercocebus atys*²².

En todos los casos conocidos el virus parece encontrarse cerca del equilibrio con su huésped natural, como resultado probable de una más o menos largacoevolución, observándose generalmente sólo versiones muy atenuadas del síndrome de inmunodeficiencia, como una reducción limitada de linfocitos T CD4+, reducción que no compromete en general la vida del individuo, aunque en un ejemplar de *Cercocebus atys* se produjo un sida típico después de 18 años de incubación. Este dato hace pensar que, al menos en parte, es la baja longevidad, unida a una larga incubación, lo que hace que la inmunodeficiencia sobrevenida sea un resultado excepcional de la infección en monos.

Descubrimiento

Desde 1981 se detectaron casos sorprendentes de infección por *Pneumocystis jiroveci* (entonces designado *Pneumocystis carinii*), un hongo emparentado con las formas originales de los Ascomycetes, conocido por infectar a pacientes severamente inmunodeprimidos. Inicialmente se observó un grupo de casos semejantes en los que estaban implicados varones homosexuales y donde aparecían a la vez infección por citomegalovirus y candidiasis. Se pensó primero que la causa debía estar ligada a prácticas comunes entre la población homosexual masculina²³.

Pronto empezaron a aparecer casos que afectaban a varones o mujeres heterosexuales usuarios de drogas intravenosas, así como a sus hijos; también entre pacientes no homosexuales y con hábitos saludables que habían recibido transfusiones de sangre entera o de productos sanguíneos por su condición de hemofílicos. Pronto se pensó, por criterios básicamente epidemiológicos, que la causa debía ser un agente infeccioso que se transmitía de forma semejante a como lo hace el virus de la hepatitis B²³.

Distintos equipos empezaron a buscar un virus asociado a los casos conocidos de inmunodeficiencia adquirida, tal vez un retrovirus como el que se sabía producía la inmunodeficiencia del gato o como el HTLV, productor de un tipo de leucemia. En 1983, en el Instituto Pasteur de París, un equipo dedicado a la investigación de la relación entre retrovirus y cáncer dirigido por J.C. Chermann, F. Barré-Sinoussi y L. Montagnier, encontró un candidato al que denominó lymphadenopathy-associated virus (virus asociado a la linfadenopatía, LAV). En 1984 el equipo de R. Gallo, descubridor del HTLV, único retrovirus humano conocido entonces, confirmó el descubrimiento, pero llamando al virus human T lymphotropic virus type III (virus linfotrópico T humano tipo III, con las siglas HTLV-III). Se produjo una subsecuente disputa sobre la prioridad en la que quedó claro que Gallo había descrito el virus sólo después de haber recibido muestras de los franceses. Como parte de la resolución del conflicto, el virus adquirió su denominación definitiva, human immunodeficiency virus (HIV) que en castellano se expresa como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En el mismo año, 1983, en que se identificó el virus, diversos equipos empezaron a trabajar en la secuencia de su genoma,

publicada a principios de 1985, y comenzó también la caracterización de sus proteínas²³.

Epidemiología

El VIH se ha convertido en una epidemia de dimensiones mundiales. El Programa Conjunto de Naciones Unidas sobre el VIH/sida (Onusida) coordina esfuerzos internacionales de científicos, gobiernos, iniciativa privada y organizaciones civiles dirigidos a actuar sobre la epidemia del VIH y sus efectos.³⁷ Onusida observa el desarrollo epidemiológico de la infección por VIH en todo el mundo y emite un reporte sobre la situación de la epidemia cada dos años. Los informes de Onusida recopilan los datos provenientes de todos los países y dan una visión general de la evolución de la pandemia, sus efectos sociales, las estrategias adoptadas para controlarla.

Mundialmente, el modo más común de propagación del VIH sigue siendo la transmisión heterosexual. Entre 1981 y 2007, el sida había causado la muerte de aproximadamente 25 millones de personas alrededor de todo el mundo. En ese mismo año, 33 millones [30-36 millones] de personas estaban infectadas con VIH. La epidemia se ha estabilizado en cuanto que no ha aumentado la proporción de personas infectadas respecto a la población total. Además se ha observado una reducción del total mundial de nuevos casos de infección por VIH, de 3 millones [2,6-3,5 millones] en 2002 a 2,7 millones [2,2-3,2 millones] en 2007³.

La región más afectada por la pandemia es África subsahariana, donde radican 21,5 millones [20,5-23,6 millones] de seropositivos. Esta cifra representa casi tres cuartos del total de casos calculados para todo el mundo. Esta región del mundo también presenta los índices más altos de mortalidad por sida y concentra el mayor número de nuevas infecciones³.

Fármacos contra el VIH

Existen numerosos fármacos dirigidos a evitar tanto la infección, como la progresión del ciclo vital del virus. Dichos fármacos se clasifican según la proteína a la que van dirigidos (esto es, el paso replicativo que inhiben en su uso). En general, y dada la alta tasa de resistencias, está indicado el uso combinado de fármacos de diferentes grupos (politerapia), en lo que se viene llamando TARGA: Terapia AntirRetroviral de Gran Actividad. Ninguno de estos fármacos ha mostrado ser efectivo por separado y, de hecho, uno de los más comunes, el llamado AZT, es altamente tóxico. [cita requerida] El AZT por sí solo no puede destruir directamente el virus; lo que hace este fármaco es inhibir la enzima transcriptasa inversa, con lo que impide que el RNA del Virus se copie hacia cDNA bicatenario y, por consiguiente, evitar que se genere un provirus (el provirus es el cDNA que se integra al genoma de la célula huésped, en este caso es el linfocito T CD4+). Administrado de forma aislada, es decir, sin ser combinado con los otros medicamentos que componen el TARGA, puede incrementar las mutaciones en el virus que lo hagan más resistente y agresivo, anulando su eficacia terapéutica y acelerando el progreso de la enfermedad. Este riesgo disminuye notablemente cuando se combina con los otros medicamentos de la politerapia. También

disminuye sensiblemente su toxicidad al reducirse y ajustarse con mejor precisión sus mínimas dosis efectivas en combinación con los otros componentes del TARGA⁴.

Detección del VIH

Debido a que no existe ninguna manifestación clínica característica de la infección de VIH, la prueba para detectar esta enfermedad ha de llevarse a cabo mediante pruebas de diagnóstico molecular en un laboratorio. La prueba más habitual para detectar la presencia de VIH es la prueba de inmunodetección denominada ELISA. Con esta técnica se pretende detectar los anticuerpos específicos que el organismo produce como respuesta a la presencia del virus. Cabe destacar que, en países donde la prevalencia de la enfermedad es baja, ante un resultado positivo mediante un ELISA, no se debe informar al paciente de la presencia de VIH sin haber confirmado antes la prueba mediante un western blot. Sin embargo, en países o determinados grupos sociales donde el VIH presenta una alta prevalencia, no será necesaria la confirmación con western blot. Por lo tanto, en la mayoría de los casos la seropositividad frente al VIH se detecta a partir de una extracción sanguínea del sujeto con la que se realizará la determinación de anticuerpos anti-VIH por alguna técnica de cribado como la ya nombrada ELISA u otras parecidas. La prueba diagnóstica dirigida al VIH tiene una especificidad del 99% y una sensibilidad del 99%. Otra prueba para detectar la presencia del VIH es la PCR nested o anidada (amplificación de un amplicón contenido dentro de otro producto de una amplificación previa), que posee muy alta especificidad y sensibilidad pero no cuantifica. Para detectar el virus insertado en el genoma, el ADN proviral, se utiliza una PCR anidada. Para detectar el ARN viral, se usa RT-PCR anidada¹⁰.

Puntos de vista alternativos

Respecto a la existencia del VIH y respecto a su origen existen puntos de vista alternativos al consenso científico. Incluyen la teoría de E. Hooper de que la barrera de especie fue atravesada como consecuencia de la utilización de riñones infectados de chimpancé para producir vacunas contra la polio, o la opinión muy extendida entre jóvenes africanos de que el VIH es un arma biológica desarrollada por Estados Unidos contra los africanos, teoría que defienden debido a la extraña facilidad del virus en mutar de diferente forma en varios cuerpos infectados o en su misterioso origen aún no descubierto más de dos décadas después del primer caso de sida¹¹.

Existen numerosos activistas, científicos y premios nobeles como Kary Mullis que niegan que el sida sea causado por el VIH, algunos de los cuales incluso dudan de la misma existencia del virus aquí descrito. Muchos niegan también que exista el sida como entidad nosológica (una enfermedad singular bien definida) interpretando que la diversidad de formas epidemiológicas y clínicas es propia de una pluralidad de enfermedades que errónea o interesadamente son interpretadas como una sola. A este respecto véase Negacionismo del VIH/sida¹².

3. ANÁLISIS DE ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

3.3. Antecedentes locales: No hay antecedentes locales.

3.4. Antecedentes Nacionales:

C-Reactive Protein (CRP), Interferon Gamma-Inducible Protein 10 (IP 10), and Lipopolysaccharide (LPS) Are Associated with Risk of Tuberculosis after Initiation of Antiretroviral Therapy in Resource-Limited Settings.

Tenforde MW, Gupte N, ACTG PEARLS and NWCS 319 Study Group.

OBJECTIVE:

The association between pre-antiretroviral (ART) inflammation and immune activation and risk for incident tuberculosis (TB) after ART initiation among adults is uncertain.

DESIGN:

Nested case-control study (n = 332) within ACTG PEARLS trial of three ART regimens among 1571 HIV-infected, treatment-naïve adults in 9 countries. We compared cases (participants with incident TB diagnosed by 96 weeks) to a random sample of controls (participants who did not develop TB, stratified by country and treatment arm).

METHODS:

We measured pre-ART C-reactive protein (CRP), EndoCab IgM, ferritin, interferon gamma (IFN- γ), interleukin 6 (IL-6), interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), lipopolysaccharide (LPS), soluble CD14 (sCD14), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and CD4/DR+/38+ and CD8/DR+/38+ T cells. Markers were defined according to established cutoff definitions when available, 75th percentile of measured values when not, and detectable versus undetectable for LPS. Using logistic regression, we measured associations between biomarkers and incident TB, adjusting for age, sex, study site, treatment arm, baseline CD4 and log10 viral load. We assessed the discriminatory value of biomarkers using receiver operating characteristic (ROC) analysis.

RESULTS:

Seventy-seven persons (4.9%) developed incident TB during follow-up. Elevated baseline CRP (aOR 3.25, 95% CI: 1.55-6.81) and IP-10 (aOR 1.89, 95% CI: 1.05-3.39), detectable plasma LPS (aOR 2.39, 95% CI: 1.13-5.06), and the established TB risk factors anemia and hypoalbuminemia were independently associated with incident TB. In ROC analysis, CRP, albumin,

and LPS improved discrimination only modestly for TB risk when added to baseline routine patient characteristics including CD4 count, body mass index, and prior TB.

CONCLUSION:

Incident TB occurs commonly after ART initiation. Although associated with higher post-ART TB risk, baseline CRP, IP-10, and LPS add limited value to routine patient characteristics in discriminating who develops active TB. Besides determining ideal cutoffs for these biomarkers, additional biomarkers should be sought that predict TB disease in ART initiators.

3.5. Antecedentes Internacionales:

CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract.

Brenchley JM

J Exp Med. 2004 Sep 20;200(6):749-59. Epub 2004 Sep 13.

The mechanisms underlying CD4(+) T cell depletion in human immunodeficiency virus (HIV) infection are not well understood.

Comparative studies of lymphoid tissues, where the vast majority of T cells reside, and peripheral blood can potentially illuminate the pathogenesis of HIV-associated disease. Here, we studied the effect of HIV infection on the activation and depletion of defined subsets of CD4(+) and CD8(+) T cells in the blood, gastrointestinal (GI) tract, and lymph node (LN). We also measured HIV-specific T cell frequencies in LNs and blood, and LN collagen deposition to define architectural changes associated with chronic inflammation. The major findings to emerge are the following: the GI tract has the most substantial CD4(+) T cell depletion at all stages of HIV disease; this depletion occurs preferentially within CCR5(+) CD4(+) T cells; HIV-associated immune activation results in abnormal accumulation of effector-type T cells within LNs; HIV-specific T cells in LNs do not account

for all effector T cells; and T cell activation in LNs is associated with abnormal collagen deposition. Taken together, these findings define the nature and extent of CD4(+) T cell depletion in lymphoid tissue and point to mechanisms of profound depletion of specific T cell subsets related to elimination of CCR5(+) CD4(+) T cell targets and disruption of T cell homeostasis that accompanies chronic immune activation.

Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections.

Brenchley JM

Blood. 2008 Oct 1;112(7):2826-35. doi: 10.1182/blood-2008-05-159301.
Epub 2008 Jul 29.

Acute HIV infection is characterized by massive loss of CD4 T cells from the gastrointestinal (GI) tract. Th17 cells are critical in the defense against microbes, particularly at mucosal surfaces. Here we analyzed Th17 cells in the blood, GI tract, and bronchoalveolar lavage of HIV-infected and uninfected humans, and SIV-infected and uninfected sooty mangabeys. We found that (1) human Th17 cells are specific for extracellular bacterial and fungal antigens, but not common viral antigens; (2) Th17 cells are infected by HIV in vivo, but not preferentially so; (3) CD4 T cells in blood of HIV-infected patients are skewed away from a Th17 phenotype toward a Th1 phenotype with cellular maturation; (4) there is significant loss of Th17 cells in the GI tract of HIV-infected patients; (5) Th17 cells are not preferentially lost from the bronchoalveolar lavage of HIV-infected patients; and (6) SIV-infected sooty mangabeys maintain healthy frequencies of Th17 cells in the blood and GI tract. These observations further elucidate the immunodeficiency of HIV disease and may provide a mechanistic basis for

the mucosal barrier breakdown that characterizes HIV infection. Finally, these data may help account for the nonprogressive nature of nonpathogenic SIV infection in sooty mangabeys.

Exposure to HIV-1 Directly Impairs Mucosal Epithelial Barrier Integrity Allowing Microbial Translocation

Aisha Nazli, Olivia Chan, Wendy N. Dobson-Belaire, Michel Ouellet, Michel J. Tremblay,

PLoS Pathog. 2010 Apr 8;6(4):e1000852. doi: 10.1371/journal.ppat.1000852.

While several clinical studies have shown that HIV-1 infection is associated with increased permeability of the intestinal tract, there is very little understanding of the mechanisms underlying HIV-induced impairment of mucosal barriers. Here we demonstrate that exposure to HIV-1 can directly breach the integrity of mucosal epithelial barrier, allowing translocation of virus and bacteria. Purified primary epithelial cells (EC) isolated from female genital tract and T84 intestinal cell line were grown to form polarized, confluent monolayers and exposed to HIV-1. HIV-1 X4 and R5 tropic laboratory strains and clinical isolates were seen to reduce transepithelial resistance (TER), a measure of monolayer integrity, by 30–60% following exposure for 24 hours, without affecting viability of cells. The decrease in TER correlated with disruption of tight junction proteins (claudin 1, 2, 4, occludin and ZO-1) and increased permeability. Treatment of ECs with HIV envelope protein gp120, but not HIV tat, also resulted in impairment of barrier function. Neutralization of gp120 significantly abrogated the effect of HIV. No changes to the barrier function were observed when ECs were exposed to Env defective mutant of HIV. Significant upregulation of

inflammatory cytokines, including TNF- α , were seen in both intestinal and genital epithelial cells following exposure to HIV-1. Neutralization of TNF- α reversed the reduction in TERs. The disruption in barrier functions was associated with viral and bacterial translocation across the epithelial monolayers. Collectively, our data shows that mucosal epithelial cells respond directly to envelope glycoprotein of HIV-1 by upregulating inflammatory cytokines that lead to impairment of barrier functions. The increased permeability could be responsible for small but significant crossing of mucosal epithelium by virus and bacteria present in the lumen of mucosa. This mechanism could be particularly relevant to mucosal transmission of HIV-1 as well as immune activation seen in HIV-1 infected individuals

4. Objetivos

Objetivo general:

Determinar el Efecto del VIH-1 sobre la producción de quimiocinas en células epiteliales de pulmón e intestino

Objetivos específicos:

Determinar cuáles son los niveles de CLL20 e IL-8 producidos por las células epiteliales pulmonares posterior a la estimulación con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS

Determinar cuáles son los niveles de CLL20 e IL-8 producidos por las células epiteliales intestinales posterior a la estimulación con TNF-alpha, IL1-beta, IL-17 y LPS.

Determinar cuál es nivel de expresión de los receptores CD4,CCR5,CXCR4 y EPCAM en las células epiteliales pulmonares.

Determinar cuál es nivel de expresión de los receptores CD4,CCR5,CXCR4 y EPCAM en las células epiteliales intestinales.

Determinar cuál es nivel de ADN proviral integrado por las células epiteliales intestinales posterior a la infección con diferentes cepas VIH-1.

Determinar cuál es nivel de ADN proviral integrado por las células epiteliales pulmonares posterior a la infección con diferentes cepas VIH-1.

Determinar cuál es el efecto de la infección con diferentes cepas de VIH-1 en las células epiteliales intestinales y pulmonares sobre la producción de CLL20 e IL-8 posterior a la estimulación con TNF-alpha e IL-17.

5. Hipótesis

Dado que en estudios anterior se ha encontrado que existe una depleción diferencial de linfocitos TH17 en la mucosa intestinal mas no en la mucosa pulmonar de pacientes infectados con VIH-1 y siendo este tejido el responsable de la quimioatracción de los mismos se plantea que el virus del VIH-1 tiene un efecto deferencial en ambas mucosas (células epiteliales intestinales y pulmonares) respecto a la producción de quimiocinas.

II. PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

1. Técnicas, Instrumentos y Materiales de Verificación

- Técnicas:

Cultivo Celular; En el presente trabajo se utilizaran células epiteliales intestinales humanas HT-29 (ATTC HTM-38) cultivadas en medio de cultivo específico McCoy 5^a(ATCC), las células epiteliales alveolares humanas A549 (ATTC CCL-185) cultivadas en medio específico F-12k (GIBCO) y las células epiteliales cervicales humanas TZM-BL (ATTC) cultivadas en medio de cultivo DMEM(GIBCO). Las medios de cultivo de las 3 líneas celulares serán suplementados al 10 % con suero fetal bovino(Sigma) y al 1 % con los antibióticos penicilina(100 U/ml) y estreptomycin(10 U/ml) cultivándose en matraces T75(Nunc) a 37°C y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambiara cada 48 horas y las células se recolectarán cada 3 días con tripsina al lograr confluencia(Tripsina 0.25% y EDTA 0.53mM).

ELISA: Los sobrenadantes de los cultivos celulares condicionados bajo diferentes patrones de estimulación serán recolectados y almacenados a -20°C hasta su uso. Las quimiocinas CCL20 (R and D Systems) e IL-8(R and D Systems) serán cuantificadas por ELISA según las instrucciones del proveedor.

Las células epiteliales de origen intestinal (HT-29 150 000 células/ml) y de origen alveolar (A549 50 000 células/ml) serán cultivadas en las placas de cultivos Costar de 48 pozos en un volumen final de 1 ml para alcanzar 80 % de confluencia 24 horas después de ser cultivadas. Después de haber alcanzado el 80 % de confluencia serán estimuladas por las citoquinas recombinantes TNF alpha(R and D Systems), IL-1B (R and D Systems), IL-17(R and D Systems) y el antígeno bacteriano LPS (Sigma Aldrich) en diferentes condiciones y concentraciones por 24 horas. Las condiciones de estimulación se realizaran por triplicado en todos los experimentos.

Reacción en cadena de la Polimerasa en tiempo real:

La cuantificación del DNA de VIH-1 integrado en genoma de las células susceptibles a infección se desarrollara como previamente se describió utilizando la técnica FRET (fluorescence resonance energy transfer) (Chomont, N., M. El-Far, et al. 2009). Las células epiteliales seran digeridas en un buffer de proteinasa K(Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) 10×10^5 células / 15ul y se utilizaran 15 ul de lisado para la amplificación. El DNA viral

integrado será amplificado primero (12 ciclos) utilizando dos primers Alu (Alu1 y Alu2) y un primer específico para la secuencia LTR del VIH-1 etiquetado con la secuencia λ , el gen CD3 fue también amplificado en la misma reacción. El ciclado de la primera reacción sera 1 min a 95°C, 1 min a 55°C y 10 min a 72°C precedido de una etapa de desnaturalización de 8 min a 95°C y una etapa final de elongación de 4 min a 95°C. Luego los amplicones de VIH y CD3 obtenidos de la primera reacción serán sometidos a una nueva amplificación de la siguiente manera. El DNA viral integrado será amplificado usando un primer complementario a la secuencia λ y otra complementaria a la región U5 LTR del virus junto a dos sondas fluorescentes específicas para la región LTR del virus. Para la amplificación del gen CD3 se utilizaran dos primers específicos junto a dos sondas fluorescentes específicas para CD3. El ciclado de la segunda reacción será 10 seg a 95°C, 10 seg a 60°C y 15seg a 72°C precedido de una etapa de desnaturalización de 8 min a 95°C y una etapa final de elongación de 4 min a 95°C. Para la curva estándar fueron utilizadas las células ACH2 (The National Institutes of Health AIDS reagent program) portadoras de una sola copia integrada del virus. Como control negativo se utilizaron células HT-29, A549 Y TZM-BL no infectadas. Los resultados se expresaron en número de copias de ADN proviral/10e6 células.

Citometría de Flujo:

Las células epiteliales HT-29 , A549 y T2M-BL serán recolectadas utilizando EDTA 1mM de los matraces T75(Nunc) y lavadas 2 veces con buffer FACS(PBS 1X, 10% FBS, 0.02% sodium azide) e incubadas con el mismo buffer por 10 min a 4°C(etapa de saturación). Posteriormente las células serán marcadas con los anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas de membrana CD4(0.5 ul/10e6 células, FITC BD Biosciences), CXCR4(0.5 ul/10e6 células, PE, BD Pharmingen), CCR5(0.5 ul/10e6 células, PE, eBioscience), EPCAM(10 ul/10e6 células, FITC, Miltenyi Biotec), IL-17R(5 ul/10e6 células, PE, eBioscience) en un volumen de 50 ul , las células se incubarán 30 min a 4°C en la oscuridad con los fluorocromos. Luego se realizará un lavado de las células con tampón FACS para eliminar el exceso de anticuerpos. Las células serán fijadas con el tampón de Fijación (Buffer FACS, 2% formaldehído) en un volumen final de 250ul. Se utilizó un citómetro de flujo LSRII de 10 colores (BD, Franklin Lakes) para la adquisición de eventos y para el análisis de los datos el software BD DIVA (BD, Franklin Lakes).

- **Instrumentos**

Citómetro de flujo LSRII de 10 colores (BD, Franklin Lakes)

LightCycler 480 II (Roche)

Espectrofotómetro ELISA

Cámara de Flujo

2. Campo de Verificación:

2.1. Ubicación Espacial:

El presente estudio se desarrollará en los laboratorios del Centro Hospitalario de la Universidad de Montreal.

2.2. Unidades de Estudio:

Las unidades de estudio serán las células epiteliales intestinales humanas HT-29 (ATTC HTM-38) originadas de adenocarcinoma de colon, las células epiteliales alveolares humanas A549 (ATTC CCL-185) originadas de carcinoma de pulmón cultivadas y las células epiteliales cervicales humanas TZM-BL (ATTC) originadas de carcinoma de cuello uterino, modificadas genéticamente para lograr la expresión constitutiva de los correceptores CD4 y CCR5.

3. Estrategia de Recolección de Datos

3.2. Recursos

3.2.1. Recursos Humanos

Autor: Tomas Raul Wiche Salinas

Asesor: Carlos Arenas Chávez, Dra Petronela Ancuta.

3.2.2. Recursos Físicos:

Fueron utilizados los laboratorios y equipos del Centro de Investigación del Centro Hospitalario de la Universidad de Montreal

3.2.3. Recursos Financieros:

Recursos de los fondos de investigación de la Dra Petronela Ancuta

3.4. Criterios o estrategias para el manejo de los resultados

Se evaluara la significancia de las diferencias observadas entre grupos utilizando el test t de student pareado. Todos los análisis fueron realizados utilizando el software GraphPad Prism 5. Los valores de p menores de 0.05 fueron considerados significativos. Cada condición experimental fue realizada en triplicado y los gráficos muestran un resultado representativo de 3 experiencias realizadas en distinto tiempo.

III. CRONOGRAMA DE TRABAJO

TIEMPO	Febrero 2015				Marzo 2015				Abril 2015			
Actividades	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Presentación y aprobación del proyecto												
Solicitud de autorización		X	x									
Recolección de datos.				x	x							
Tabulación, análisis e interpretación de datos.						x	X					
Elaboración del Informe final.								x	X			
Sustentación de la tesis										x	x	x

IV. BIBLIOGRAFIA:

1. Ancuta, P., A. Kamat, et al. (2008). "Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients." PLoS One 3(6): e2516.
2. Ancuta, P., P. Monteiro, et al. (2010). "Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS 5(2): 158-165.
3. Bomsel, M. and A. Alfsen (2003). "Entry of viruses through the epithelial barrier: pathogenic trickery." Nat Rev Mol Cell Biol 4(1): 57-68.
4. Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "HIV infection and the gastrointestinal immune system." Mucosal Immunol 1(1): 23-30.
5. Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2008). "The mucosal barrier and immune activation in HIV pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS 3(3): 356-361.
6. Brenchley, J. M., M. Paiardini, et al. (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." Blood 112(7): 2826-2835.
7. Chen, K., J. Huang, et al. (2006). "Alpha interferon potently enhances the anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of APOBEC3G in resting primary CD4 T cells." J Virol 80(15): 7645-7657.

8. Chomont, N., M. El-Far, et al. (2009). "HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation." *Nat Med* 15(8): 893-900.
9. Dandekar, S., M. D. George, et al. (2010). "Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier." *Curr Opin HIV AIDS* 5(2): 173-178.
10. Dann, S. M. and L. Eckmann (2007). "Innate immune defenses in the intestinal tract." *Curr Opin Gastroenterol* 23(2): 115-120. de Silva, T. I., M. Cotten, et al. (2008). "HIV-2: the forgotten AIDS virus." *Trends Microbiol* 16(12): 588-595.
11. Doms, R. W. (2001). "Chemokine receptors and HIV entry." *AIDS* 15 Suppl 1: S34-35.
12. Estes, J. D., L. D. Harris, et al. (2010). "Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections." *PLoS Pathog* 6(8).
13. Gosselin, A., P. Monteiro, et al. (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." *J Immunol* 184(3): 1604-1616.
14. Hartupée, J., C. Liu, et al. (2007). "IL-17 enhances chemokine gene expression through mRNA stabilization." *J Immunol* 179(6): 4135-4141.
15. Jordan, N. J., G. Kolios, et al. (1999). "Expression of functional CXCR4 chemokine receptors on human colonic epithelial cells." *J Clin Invest* 104(8): 1061-1069.
16. Kelly, C. P., S. Keates, et al. (1994). "IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells." *Am J Physiol* 267(6 Pt 1): G991-997.
17. Kinugasa, T., T. Sakaguchi, et al. (2000). "Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators." *Gastroenterology* 118(6): 1001-1011.

18. Kolls, J. K. and S. A. Khader (2010). "The role of Th17 cytokines in primary mucosal immunity." *Cytokine Growth Factor Rev* 21(6): 443-448.
19. Kwon, J. H., S. Keates, et al. (2002). "Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease." *Gut* 51(6): 818-826.
20. Lederer, S., D. Favre, et al. (2009). "Transcriptional profiling in pathogenic and nonpathogenic SIV infections reveals significant distinctions in kinetics and tissue compartmentalization." *PLoS Pathog* 5(2): e1000296.
21. Lee, J. W., P. Wang, et al. (2008). "Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells." *J Immunol* 181(9): 6536-6545.
22. Monteiro, P., A. Gosselin, et al. (2011). "Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." *J Immunol* 186(8): 4618-4630.
23. Murdoch, C., P. N. Monk, et al. (1999). "Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells." *Immunology* 98(1): 36-41.
24. Nazli, A., O. Chan, et al. (2010). "Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation." *PLoS Pathog* 6(4): e1000852.
25. Pelletier, M., L. Maggi, et al. (2010). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." *Blood* 115(2): 335-343.
26. Starner, T. D., C. K. Barker, et al. (2003). "CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties." *Am J Respir Cell Mol Biol* 29(5): 627-633.
- Stevenson, M. (2003). "HIV-1 pathogenesis." *Nat Med* 9(7): 853-860.

27. Schutyser, E., S. Struyf, et al. (2003). "The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6." *Cytokine Growth Factor Rev* 14(5): 409-426.

